

873 PCT

Mod. C.E. - 1 - 4 7

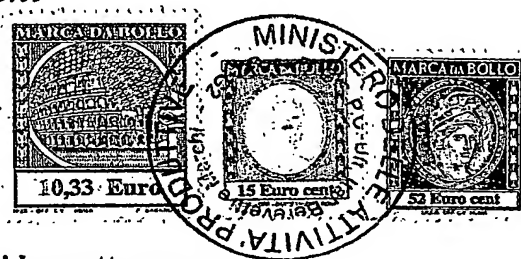


Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

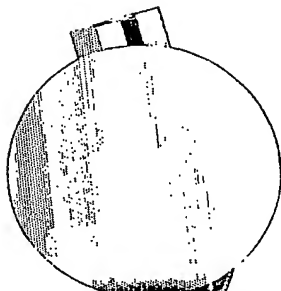


**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2003 A 001942.**

EP/04/11161

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

DMA li..... 15 NOV. 2004



BEST AVAILABLE COPY

IL FUNZIONARIO

..... Giampietro Carlotto

Giampietro Carlotto

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (1)

1) Denominazione INDENA S.p.A.Residenza Milano

codice

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.via Rossinin. 8città Milanocap 20122(prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci)

gruppo/sottogruppo

"DNA codificante p185^{neu} e suoi usi terapeutici"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Amici Augusto3) Forni Guido2) Cavallo Federica4) Marchini Cristina

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1)

2)

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 1

PROV

n. pag. 51

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) 1

PROV

n. tav. 14

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) Q

RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4) Q

RIS

designazione inventore

Doc. 5) Q

RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) Q

RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) Q

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

Quattrocentosettantadue/56#

obbligatorio

COMPILATO IL

09/10/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi Paolo

CONTINUA SI/NO

NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANOMILANOcodice 155

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2003A 001942

Reg. A.

L'anno DUEMILATREil giorno NOVE

del mese di

OTTOBREIl(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda confidando di 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE IL RAPPRESENTANTE È INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA CIRCOLARE N. 423 DEL 01.03.2001 E CONFERMA IL DEPOSITO CON RISERVA DI LETTERA D'INCARICO.

IL RAPPRESENTANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE/ DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

D. TITOLO

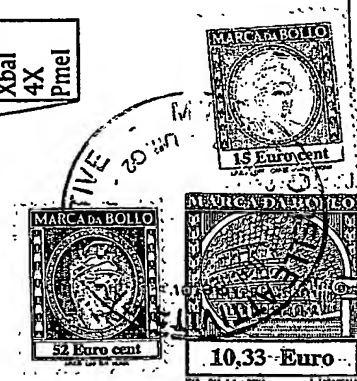
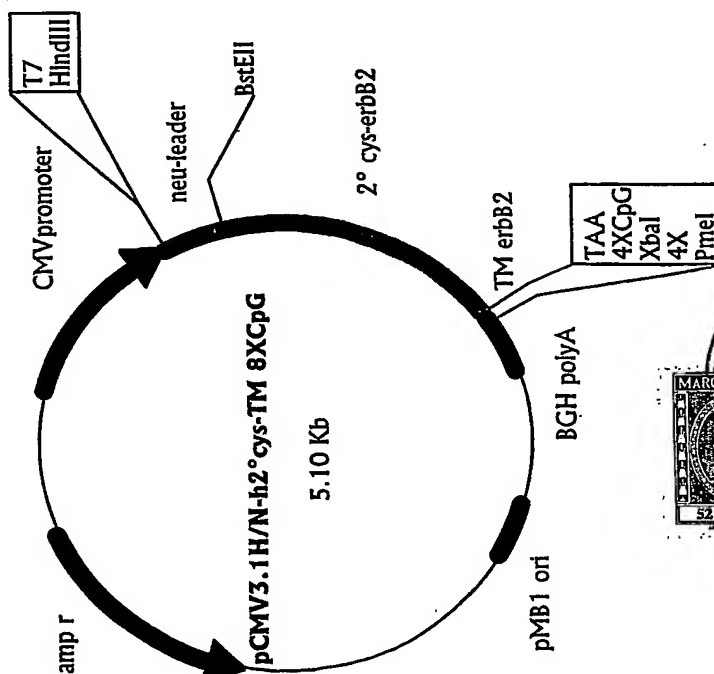
"DNA codificante p185^{neu} e suoi usi terapeutici"

L. RIASSUNTO

Si descrivono plasmidi contenenti sequenze codificanti diversi frammenti dell'oncoproteina p185^{neu}, in grado di indurre una risposta immunitaria contro tumori esprimenti oncogeni della famiglia ErbB, e loro composizioni farmaceutiche.

M. DISEGNO

FIGURA 1

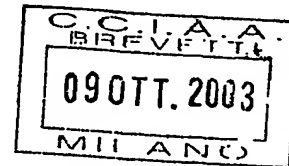


18 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

/mc "DNA CODIFICANTE p185^{neu} E SUOI USI TERAPEUTICI"

a nome : INDENA S.p.A.

con sede in: Milano



* * *

MI 2003A001942

La presente invenzione riguarda vettori plasmidici contenenti sequenze codificanti la p185^{neu} e il loro uso nella vaccinazione a DNA contro i tumori. I plasmidi secondo l'invenzione contengono sequenze codificanti diversi frammenti dell'oncoproteina p185^{neu} umana o di ratto e sono in grado di indurre una risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata contro tumori esprimenti oncogeni della famiglia ErbB.

L'invenzione riguarda inoltre composizioni farmaceutiche contenenti tali plasmidi e il loro uso nel trattamento preventivo o terapeutico di tumori esprimenti p185^{neu}.

Sfondo dell'invenzione

La proteina p185^{neu}, uno dei più studiati antigeni tumorali, ha suscitato un grande interesse come bersaglio di immunoterapie contro il cancro grazie alla sua presenza sulla membrana delle cellule di alcuni fra i più comuni carcinomi umani. La p185^{neu} è un recettore di membrana codificato nel ratto dal proto-oncogene Her-2/neu ed appartenente alla famiglia dei Recettori Tirosin Chinasi (RTKs) di classe I, che comprende anche il Recettore del Fattore di crescita epidermico EGF-R (ErbB-1) ed altri recettori ad esso correlati (ErbB-3, ErbB-4) critici per la proliferazione e il differenziamento cellulare (Hynes and Stern, 1994 BBA 1198:165), ed attualmente oggetto di grande interesse biologico e clinico. Questo recettore è costituito da tre

domini ben distinti: extracellulare, transmembrana e intracitoplasmatico. La p185^{neu} è coinvolta nella complessa rete dei meccanismi di trasmissione intracellulare del segnale e di comunicazione intercellulare che regola i processi di proliferazione e differenziamento (Boyle 1992 Curr. Op. Oncol. 4:156). L'oncogene *neu* deve il suo nome al neuroglioblastoma di ratto indotto chimicamente da cui è stato inizialmente isolato. Questa forma attivata di *neu* presenta una singola mutazione puntiforme che risulta nel cambiamento di una A in T e nella conseguente sostituzione del residuo di Valina in posizione 664 della p185^{neu} con un residuo di Acido Glutammico (Val664Glu) (Bargmann et al. 1986, Cell 45:649).

Anche l'omologo umano di *neu*, ErbB-2, è stato isolato e caratterizzato ed è stato dimostrato che sia il recettore HER2/*neu* di ratto che l'ErbB2 dell'uomo presentano una significativa omologia con EGFR (Coussens et al. 1985, Science 230:1132; Yamamoto et al. 1986, Nature 319:230). Mentre nel ratto un'alterazione qualitativa (mutazione genica) è alla base della costitutiva attivazione dei recettori tramite dimerizzazione, nei tumori umani ErbB-2 positivi, si riscontra soprattutto una marcata alterazione di tipo quantitativo dell'espressione dell'oncogene (Di Marco et al. 1990, Mol. Cell. Biol. 10: 3247; Klapper et al., 2000, Adv Cancer Res, 77:25), sebbene, in rari casi, siano state individuate mutazioni puntiformi attivanti, o aberranti meccanismi di splicing (Kwong et al., 1998, Mol Carcinog, 23:62; Xie et al., 2000, J Natl Cancer Inst, 92:412). L'effetto complessivo è, tutto sommato, assimilabile: l'amplificazione genica e l'aumento del livello di trascrizione portano ad un eccesso della molecola recettoriale p185^{neu} sulla membrana, con conseguente aumento dei dimeri attivi, trasducenti positivi segnali di crescita all'interno

della cellula, anche in questo caso in modo ligando-indipendente. Recentemente è stata pubblicata la struttura cristallografica della regione extracellulare della p185^{neu} umana e di ratto ed è stato evidenziato che questa proteina è caratterizzata da una conformazione fissa, che le consente, pur non legandosi direttamente ad alcun ligando, di interagire con gli altri recettori ErbB, dimerizzare ed innescare la trasduzione del segnale di proliferazione (Cho HS et al. 2003, Nature 421:756).

Nell'uomo, in condizioni normali, la p185^{neu} è coinvolta nell'organogenesi e nella crescita epiteliale, è espressa ad elevati livelli durante la formazione della placenta e lo sviluppo fetale, mentre è presente a livelli appena rilevabili in molti tessuti adulti (Press et al. 1990, Oncogene 5:953). Molti studi hanno dimostrato che l'iperespressione della p185^{neu} nell'uomo è associata al processo neoplastico e correla con caratteristiche peggiori di aggressività del tumore. L'iperespressione della p185^{neu} è stata descritta nel caso di adenocarcinomi del polmone (Kern et al. 1986, Cancer Res. 50:5184), del colon (Cohen et al. 1989, Oncogene 4:81), dell'ovaio (Slamon et al. 1989, Science 244:707) e in una elevata percentuale di carcinomi mammari umani (Slamon et al. 1989, Science 244:707; Jardines et al. 1993, Pathobiology 61:268).

Le proprietà fondamentali che rendono la p185^{neu} un ottimo bersaglio della vaccinazione con plasmidi sono: a) il suo diretto coinvolgimento nella crescita cellulare e nella carcinogenesi, per cui le varianti clonali che, per instabilità genetica del tumore, perdono l'espressione di questo antigene perdono anche la loro tumorigenicità; b) la sua espressione sulla membrana plasmatica, fatto questo che la rende riconoscibile da parte degli anticorpi

anche nelle cellule tumorali che perdono l'espressione delle glicoproteine del sistema maggiore di istocompatibilità (Lollini P. and Forni G. 2003, Trends Immunol. 24: 62).

Studi condotti sia su modelli di topi transgenici per l'oncogene Her-2/neu attivato di ratto (che spontaneamente sviluppano tumori mammari p185^{neu} positivi) che su modelli murini basati sull'impiego di linee tumorali trapiantabili p185^{neu} positive, hanno dimostrato che la prevenzione e la cura delle lesioni preneoplastiche è un obiettivo raggiungibile. In particolare, in esperimenti di prevenzione dello sviluppo di tumori mammari in topi transgenici per l'Her-2/neu attivato di ratto, abbiamo dimostrato che il plasmide che codifica i domini extracellulare e transmembrana della p185^{neu} di ratto è in grado di indurre una protezione *in vivo* più efficace rispetto al plasmide che codifica l'intera p185^{neu} di ratto e a quello che ne codifica il solo dominio extra-cellulare (antigene secreto) (Amici A. et al. 2000, Gene Ther., 7: 703; Rovero S. et al. 2000, J. of Immunol., 165: 5133). Dati analoghi sono stati riportati da Chen et al. (1998, Cancer Res 58:1965). Altri Autori hanno dimostrato che plasmidi codificanti la proteina p185^{neu}, intera oppure intera ma mutata in modo da eliminare la sua attività tirosin chinasi, sono efficaci nel prevenire l'insorgenza di tumori a seguito dell'inoculo di cellule p185^{neu} positive (Wei WZ et al. 1999, Int. J. Cancer 81: 748). Inoltre, gli stessi plasmidi privi del segnale responsabile del processamento attraverso il reticolo endoplasmatico (leader) che quindi determinano la localizzazione citoplasmatica dell'antigene p185^{neu} si sono rivelati altrettanto efficaci. La protezione indotta dai diversi plasmidi era mediata prevalentemente da una risposta immunitaria di tipo umorale nel caso dell'espressione in membrana



della p185^{neu}, e prevalentemente da una risposta immunitaria mediata dai linfociti T nel caso della localizzazione citoplasmatica della p185^{neu} (Pilon SA et al. 2001, J. of Immunol. 167: 3201). Tuttavia, la vaccinazione combinata utilizzando sia i plasmidi che determinavano l'espressione della p185^{neu} nel citoplasma che sulla membrana risultava comunque più efficace nella protezione contro la crescita tumorale (Piechocki MP et al. 2001, J. Immunol. 167: 3367). Quindi potrebbe essere particolarmente importante il bilanciamento tra i diversi meccanismi effettori della risposta immunitaria (Reilly et al., 2001, Cancer Res. 61: 880). Inoltre si è visto che la vaccinazione con plasmidi codificanti i domini extracellulare e transmembrana della p185^{neu} di ratto, è in grado di eradicare masse tumorali di due millimetri di diametro, sviluppatesi in seguito ad inoculo con cellule iperesprimenti la p185^{neu}, coinvolgendo una serie di meccanismi effettori del sistema immunitario (cellule T helper e T killer, anticorpi, macrofagi, neutrofili, cellule natural killer, recettori Fc, IFN gamma e perforine) che in modo coordinato contribuiscono al rigetto del tumore (Curcio C. et al. 2003, J. Clin. Invest. 111: 1161).

Descrizione dell'invenzione

Sono stati preparati diversi costrutti codificanti frammenti della proteina p185^{neu} umana o "chimerica" uomo/ratto, successivamente inseriti in vettori plasmidici e utilizzati in esperimenti d'immunizzazione volti a prevenire la progressione tumorale nei topi. Per la costruzione dei plasmidi sono stati prodotti frammenti della proteina p185^{neu} contenenti il dominio transmembrana e porzioni del dominio extracellulare di lunghezza decrescente, utilizzando la sequenza umana codificata dall'oncogene ErbB2 o

sostituendo parti di questa con sequenze omologhe del cDNA dell'Her-2/neu di ratto, in modo da creare plasmidi chimera uomo/ratto.

I plasmidi così prodotti sono stati valutati in esperimenti di vaccinazione di topi inoculati con cellule tumorali iper-esprimenti p185^{neu} umana. Ciascun plasmide era in grado di indurre selettivamente risposte immunitarie di tipo diverso. In particolare, i plasmidi contenenti forme tronche di p185^{neu} inducevano una reattività antitumorale mediata da linfociti T killer e helper, mentre i plasmidi chimera inducevano una risposta anticorpale sia verso la p185^{neu} umana che verso la p185^{neu} di-ratto.

Sulla base dei risultati degli esperimenti in vivo sono stati selezionati i plasmidi in grado di indurre una forte risposta immunitaria sia di tipo anticorpale sia mediata da linfociti T killer ed helper. Tali plasmidi, oggetto della presente invenzione, contengono una sequenza codificante per un frammento di p185^{neu} scelta dal gruppo costituito da SEQ ID N. 1 - 14 (le sequenze di riferimento per p185^{neu} umana e di ratto sono depositate in Gene Bank con accession number M11730 e, rispettivamente, X03362).

Le sequenze codificanti p185^{neu} secondo l'invenzione possono essere inserite in qualunque vettore plasmidico idoneo alla somministrazione umana. Oltre alle sequenze codificanti sopra indicate, i plasmidi possono contenere elementi funzionali per il controllo della trascrizione, in particolare un promotore localizzato a monte della sequenza codificante, preferibilmente il promotore CMV, sequenze di inizio e fine della trascrizione, marker di selezione, quali il gene per la resistenza all'ampicillina o alla kanamicina, motivi CpG, un sito di poliadenilazione ed eventualmente enhancer o attivatori della trascrizione. Gli elementi deputati al controllo della

trascrizione devono essere compatibili con l'uso del vettore nell'uomo. In una realizzazione preferita, i plasmidi dell'invenzione contengono almeno 4 motivi CpG, preferibilmente almeno 8, fino ad un massimo di 80. I motivi CpG (ATAATCGACGTTCAA), di origine batterica, inducono i macrofagi a secernere IL-12, che a sua volta induce la secrezione di IFN gamma da parte delle cellule natural killer, attivando così una risposta mediata dai linfociti T helper (Chu R.S. et al. 1997, J. Exp. Med., 186: 1623). Pertanto, l'inserimento dei motivi CpG all'interno delle sequenze plasmidiche potenzia la risposta immunitaria indotta dall'antigene codificato dal plasmide.

Secondo un altro aspetto, l'invenzione è diretta a una composizione farmaceutica contenente un plasmide come sopra definito insieme a veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili. Le composizioni farmaceutiche, in una forma idonea alla somministrazione parenterale, preferibilmente in forma di soluzione iniettabile, sono preferibilmente utilizzate in tecniche di vaccinazione a DNA. I principi e i metodi per la vaccinazione a DNA sono noti all'esperto del settore e sono descritti per esempio in Liu MA 2003; J Int Med 253: 402.

I plasmidi secondo l'invenzione, opportunamente formulati, vengono utilizzati nel trattamento preventivo o terapeutico di soggetti a rischio di sviluppo di tumori p185^{neu} positivi, o di pazienti portatori di tumori primari, metastasi o recidive di tumori p185^{neu} positivi. La prevenzione può essere primaria, quando il tumore non è ancora manifesto, secondaria, quando il tumore è nelle fasi iniziali come lesione preneoplastica, o terziaria, in caso di recidiva tumorale o di processo metastatico. I tumori che possono beneficiare del trattamento con i plasmidi dell'invenzione sono quelli di origine epiteliale,

in particolare adenocarcinoma polmonare, ovarico e carcinoma mammario, più in generale i tumori esprimenti la p185^{neu}.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Costruzione dello scheletro plasmidico pCMV3.1

Per poter costruire i plasmidi codificanti frammenti della p185^{neu} umana e i plasmidi chimera abbiamo utilizzato uno scheletro plasmidico denominato pCMV3.1. Su questo nostro scheletro plasmidico sono stati inseriti i frammenti derivati dal cDNA del protooncogene ErbB-2 umano e dal cDNA del protooncogene Her-2/neu di ratto. Questo scheletro plasmidico pCMV3.1 è stato ottenuto partendo dal plasmide usato per l'espressione negli eucarioti pcDNA3.1 (Invitrogen, Milano, Italia), eliminando con gli enzimi di restrizione DraIII (nt1531) e BsmI (nt3189) un frammento di 1658 bp contenente l'origine di replicazione f1, l'origine di replicazione e l'early promoter di SV40, il gene che codifica la resistenza alla neomicina ed il segnale di poliadenilazione di SV40. Lo scheletro plasmidico che ne risulta (il pCMV3.1) presenta diversi vantaggi rispetto al pcDNA3.1 originale. Infatti, sia la riduzione delle dimensioni a 3900 bp sia l'eliminazione della sequenza codificante i geni irrilevanti al nostro scopo contribuiscono all'aumento dell'efficienza della trasfezione *in vivo*.

Costruzione del plasmide pCMV3.1erbB2

All'interno del sito multiplo di clonaggio dello scheletro plasmidico pCMV3.1 è stato inserito il cDNA di ErbB2 umano, ottenuto dal plasmide pSVerbB2, nei siti di restrizione HindIII e XbaI. Questo plasmide costituisce il punto di partenza per la costruzione dei plasmidi esprimenti la p185^{neu} tronca e dei plasmidi chimera.



*Costruzione dei plasmidi contenenti la sequenza 4XCpG:
pCMV3.1hECD-TM-4CpG e pCMV3.1hECD-TM-4noCpG*

Partendo dal plasmide pCMV3.1-erbB2 ed eliminando la sequenza che codifica il dominio intracitoplasmatico, abbiamo preparato due plasmidi che codificano entrambi le regioni extracellulare e transmembrana del protooncogene ErbB2. La procedura seguita ha previsto prima l'analisi di restrizione per identificare i siti unici presenti nella sequenza nucleotidica del cDNA di ErbB2. Dall'analisi di restrizione è stato individuato un sito unico riconosciuto dall'enzima AccIII presente (nt 2195) circa 20 bp dopo il termine del dominio transmembrana. L'eliminazione del dominio intracitoplasmatico è stato possibile utilizzando l'enzima AccIII presente come sito unico di restrizione e l'enzima XbaI. Per inserire di nuovo all'estremità 3' del cDNA dell'ECD-TM di ErbB2 la tripletta nucleotidica TAA, riconosciuta come segnale di stop della traduzione, abbiamo usato due sequenze sintetiche composte da due oligonucleotidi senso (oligonucleotide #1, #3) ed antisenso (oligonucleotide #2, #4) con alle proprie estremità i siti di restrizione AccIII e XbaI. In queste sequenze sintetiche da noi usate sono presenti anche quattro sequenze ripetute CpG e noCpG. La sequenza noCpG funge da controllo sperimentale negativo. Questi due nuovi plasmidi sono stati nominati pCMV3.1hECD-TM-4CpG e pCMV3.1hECD-TM-4noCpG.

*Costruzione dei plasmidi contenenti la sequenza 8XCpG:
pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG e pCMV3.1H/NhECD-TM-8noCpG*

Per aggiungere ulteriori stimoli immunitari aspecifici abbiamo costruito un nuovo scheletro plasmidico contenente 4 sequenze immunostimolatorie CpG denominato pCMV3.1 H/N-4CpG. A tale scopo abbiamo modificato il

pCMV3.1 per eliminare uno dei due siti di restrizione per l'enzima PmeI ed invertire i siti di restrizione per HindIII e NheI presenti sul suo sito multiplo di clonaggio grazie ad una sequenza sintetica costituita da due oligonucleotidi senso (oligonucleotide #5) ed antisenso (oligonucleotide #6). In questo nuovo plasmide, chiamato pCMV3.1 H/N, sono state inserite due sequenze sintetiche, costituite da due oligonucleotidi senso (oligonucleotide #7, #9) ed antisenso (oligonucleotide #8, #10), contenenti quattro ripetizioni per le sequenze CpG e noCpG nei siti unici di restrizione XbaI e PmeI, ottenendo così il pCMV3.1 H/N-4CpG e 4noCpG. Successivamente i frammenti di DNA hECD-TM-4CpG e hECD-TM-4noCpG sono stati inseriti rispettivamente in pCMV3.1 H/N-4CpG ed in pCMV3.1 H/N-4noCpG, ottenendo così due nuovi plasmidi chiamati pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG e pCMV3.1H/N-hECD-TM-8noCpG.

*Costruzione del plasmide contenente la sequenza del secondo dominio cisteinico e del dominio transmembrana della p185^{neu} umana:
pCMV3.1H/Nh2^ocysECD-TM-8CpG*

Il dominio extracellulare della p185^{neu} umana è caratterizzato da due zone ricche in cisteine, chiamate appunto 1° e 2° sub-dominio cisteinico (1°cys e 2°cys). A differenza della sequenza del cDNA di ratto in cui è presente un solo sito BstEII (nt1250) nel dominio extracellulare ed è posto nella regione nucleotidica che separa 1°cys da 2°cys, la sequenza del cDNA del dominio extracellulare di ErbB2 presenta due siti di restrizione per BstEII: oltre al sito in posizione identica a quello di ratto (nt1372), un altro sito BstEII (nt963) è presente nella porzione che codifica 1°cys del dominio extracellulare. Digerendo il plasmide pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG con HindIII e BstEII è

stato possibile ottenere un frammento di DNA costituito dal 2°cys del dominio extracellulare, il dominio transmembrana, la sequenza 8CpG ed il plasmide pCMV3.1H/N. È stato poi aggiunto il segnale per la secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico della p185^{neu} di ratto, ottenuto mediante amplificazione enzimatica del DNA (reazione di PCR) utilizzando un oligonucleotide senso costituito dal primer T7 (oligonucleotide #11) che riconosce il promotore della T7 RNA polimerasi, presente all'inizio del sito multiplo di clonaggio del pCMV3.1H/N, ed un oligonucleotide antisenso (oligonucleotide #12) con alla sua estremità il sito BstEII. Dopo purificazione, digestione enzimatica del frammento amplificato con gli enzimi di restrizione HindIII e BstEII e conseguente clonaggio è stato ottenuto il pCMV3.1H/Nh2°cys-TM-8CpG (Fig. 1). Questo plasmide è stato usato in esperimenti di vaccinazione per paragonarlo al pCMV3.1 H/NhECD-TM-8CpG. È stato successivamente preparato un cDNA chimera che codifica la proteina di fusione tra il 2°cys ed il dominio transmembrana (nt 1372-nt 2204) della sequenza umana e il 1°cys (nt 1-nt 1250) della sequenza di ratto. La ricostituzione dell'intera sequenza proteica ottenuta da una porzione derivante dal cDNA di ratto fusa ad una porzione del cDNA umano aumenta in modo vantaggioso la risposta immunitaria.

Costruzione del plasmide chimera contenente la sequenza del primo dominio cisteinico della p185^{neu} di ratto e del secondo dominio cisteinico e del dominio transmembrana della p185^{neu} umana: pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG

A differenza della sequenza del cDNA di ratto in cui è presente un solo sito BstEII (nt1250) nel dominio extracellulare posto nella regione nucleotidica che separa la prima e la seconda zona ricca in cisteine, la sequenza del cDNA

del dominio extracellulare di ErbB2 presenta due siti di restrizione per BstEII: il sito in posizione 1372 (nt) come nella sequenza di ratto ed un altro sito in posizione 963 (nt), situato quindi nella porzione di sequenza che codifica la 1°cys del dominio extracellulare. Grazie al sito BstEII presente nella stessa posizione sia nel cDNA di ratto (1250nt) sia nel cDNA umano (1372nt) è stato possibile costruire un plasmide capace di codificare un prodotto di fusione tra il 1°cys di ratto e il 2°cys umano. Infatti digerendo il pCMV3.1H/N-h2°cysTM-8CpG con gli enzimi di restrizione HindIII e BstEII è stato possibile eliminare il frammento di DNA che codifica il segnale di secrezione della p185^{neu} di ratto ed al suo posto è stata inserita la sequenza nucleotidica codificante il 1°cys di ratto ottenuta digerendo con gli stessi enzimi il pCMV3.1rECD-TM-4CpG. Il prodotto proteico, espresso dal plasmide pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG (Fig. 2), è quindi composto da una porzione di 412 aa della p185^{neu} di ratto e da una di 274 aa della p185^{neu} umana. Questo nuovo plasmide, il pCMV3.1H/Nr1°cys-h2°cysTM-8CpG, è stato usato in esperimenti di vaccinazione per paragonarlo al pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG. Sorprendentemente, il plasmide che codifica la proteina chimera induce nei topi una protezione totale (100%) verso tumori che esprimono la p185^{neu} umana (Tabella). Questa protezione è eguale a quella indotta dal pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG. Inoltre, l'analisi dei sieri dei topi vaccinati con entrambi i plasmidi ha evidenziato un titolo anticorpale simile verso la p185^{neu} umana.

Plasmidi in grado di codificare frammenti decrescenti del dominio extracellulare e transmembrana della p185^{neu} umana

Successivamente siamo passati alla costruzione di sette plasmidi che codificano frammenti decrescenti del dominio extracellulare e transmembrana



della p185^{neu} umana. Questi plasmidi sono stati denominati: pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG (-70 aa), pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG (-150 aa), pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG (-230 aa), pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG (-310 aa), pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG (-390 aa), pCMV3.1H/NhECD6-TM-8CpG (-470 aa) e pCMV3.1H/NhECD7-TM-8CpG (-550 aa).

Il frammento codificato dal primo di questi plasmidi è di 70 aa (delezione di 360 bp) più corto. Tutti gli altri sono, via a via, più corti di 80 aa (delezioni di 240 bp).

Questi frammenti sono stati ottenuti mediante amplificazione enzimatica del DNA, utilizzando sette diversi oligonucleotidi senso con all'estremità il sito di restrizione NheI (oligonucleotidi #13-#19) e un oligonucleotide antisenso (oligonucleotide #20) capace di riconoscere il sito chiamato "pcDNA3.1/BGH Reverse priming site" (830-850 nt) presente all'estremità 3' del sito multiplo di clonaggio del pCMV3.1. In seguito a digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione NheI e PmeI, i prodotti di amplificazione sono stati clonati all'interno del plasmide pCMV3.1H/N-neu leader, precedentemente ottenuto inserendovi il segnale di secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico della p185^{neu} di ratto nei siti di restrizione HindIII ed NheI. Il frammento di DNA relativo al segnale di secrezione della p185^{neu} di ratto è stato ottenuto mediante amplificazione enzimatica del DNA usando come oligonucleotide senso il primer T7 (oligonucleotide #11) e un oligonucleotide antisenso (oligonucleotide #21) con all'estremità il sito NheI. Il frammento amplificato dopo purificazione e digestioni di restrizione con HindIII e NheI è stato clonato nel plasmide

pCMV3.1H/N digerito con gli stessi enzimi, ottenendo così il pCMV3.1H/N-neu leader. Le diverse forme tronche della p185^{neu} umana codificate da questi plasmidi, grazie alla presenza del segnale di secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico della p185^{neu} di ratto, dovrebbero essere espressi in membrana. I plasmidi codificanti le prime quattro forme tronche (pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG (Fig. 3), pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG (Fig. 4), pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG (Fig. 5), pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG (Fig. 6) così come il plasmide pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG, che funge da controllo, proteggono il 100% dei topi vaccinati verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana (Tabella). Il plasmide pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG (Fig. 7) protegge il 60% degli animali (Tabella), mentre i plasmidi pCMV3.1H/NhECD6-TM-8CpG e pCMV3.1H/NhECD7-TM-8CpG (Fig. 8, 9), non hanno nessun effetto protettivo verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana (Tabella). I prodotti proteici espressi dai diversi plasmidi non sono secreti attraverso il reticolo endoplasmatico. La mancanza di sequenze consensus, importanti per la glicosilazione e necessarie per il loro processamento attraverso l'apparato del Golgi, o cambiamenti conformazionali dovuti alle delezioni di amminoacidi al termine -NH₂, potrebbero spiegare l'assenza dei prodotti proteici in membrana. Quindi, per verificare ulteriormente la corretta espressione sulla membrana plasmatica delle diverse forme tronche del dominio extracellulare e transmembrana della p185^{neu} umana sono stati generati dei nuovi plasmidi capaci di codificare proteine di fusione caratterizzate dall'epitopo myc all'estremità -NH₂ terminale. Tali proteine ricombinanti sono riconosciute da un anticorpo

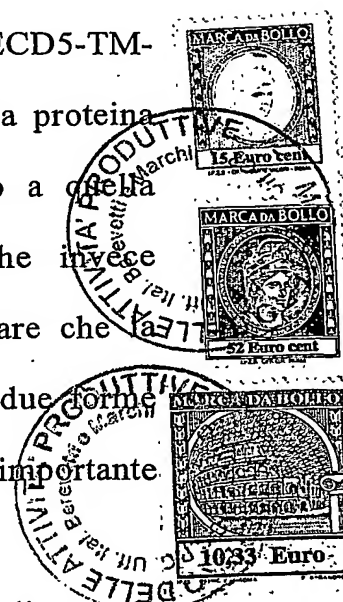
monoclonale anti-myc e quindi è possibile analizzare la loro espressione e la loro localizzazione al microscopio confocale. Dapprima è stato creato un nuovo plasmide in grado di codificare il segnale di secrezione attraverso il reticolo endoplasmatico di ratto (neu leader) e l'epitopo myc. Il clonaggio è stato effettuato usando una sequenza sintetica costituita da un oligonucleotide senso (oligonucleotide #22) ed uno antisenso (oligonucleotide #23) con alle due estremità il sito NheI. Il sito NheI presente in posizione 5' è stato mutato in modo che, una volta avvenuto correttamente il processo di ligazione, non venisse più riconosciuto dall'enzima. In questo modo abbiamo ottenuto il pCMV3.1H/Nneuleader-epitopo myc. All'interno di questo plasmide, nei siti di restrizione NheI e PmeI, sono state clonate le sequenze codificanti le forme tronche della p185^{neu} umana. Con questi plasmidi sono stati transfettati *in vitro*, mediante lipofectamina 2000 (Invitrogen, Milano, Italia), i fibroblasti 3T3 NIH. Dopo 48 ore le cellule transfettate sono state analizzate al microscopio confocale, utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-myc FITC coniugato (Sigma-Aldrich Srl, Milano, Italia). È stato così dimostrato che tutti i plasmidi per le forme tronche codificano per prodotti proteici localizzati solo a livello citoplasmatico. Parallelamente i fibroblasti 3T3 NIH sono stati trasfettati con il plasmide pCMV3.1H/NhECD-TM-8CpG ed analizzati al microscopio confocale usando l'anticorpo monoclonale c-erbB2/c-neu Ab-3 (Oncogene, Boston, MA) come anticorpo primario e un anticorpo secondario anti-mouse FITC coniugato (PharMingen, San Diego, CA). È stato così evidenziato che l'ECD-TM umano viene espresso in membrana. I risultati ottenuti, usando i primi quattro plasmidi descritti precedentemente (pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG,

pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG),
dimostrano che una risposta di tipo cellulare è sufficiente nella prevenzione antitumorale. Tuttavia si sa che la contemporanea attivazione della risposta cellulare e di quella umorale è necessaria per una terapia più efficace (Rielly et al., 2001, Cancer Res 61:880). Come è stato già descritto nel paragrafo precedente, la proteina chimera codificata dal plasmide pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG è in grado di proteggere il 100% degli animali vaccinati ed è capace di indurre nei topi una forte risposta umorale.

Plasmidi chimera in grado di codificare cinque diverse p185^{neu} chimera uomo-ratto

Per la costruzione dei plasmidi codificanti le proteine chimera sono stati scelti il pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG, il pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG, il pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG ed il pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG. Questi quattro plasmidi proteggono il 100% dei topi vaccinati verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana. È stato scelto anche un quinto plasmide di partenza, il pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG anche se protegge solo il 60% dei topi vaccinati, perché la proteina codificata da questo plasmide differisce solo di 17 aa rispetto a quella codificata dal pCMV3.1H/Nh2°cysECD-TM-8CpG (275 aa) che invece protegge soltanto il 20% dei topi vaccinati. È possibile ipotizzare che la sequenza peptidica di 17 aa, che costituisce la differenza tra le due forme proteiche codificate da questi plasmidi, corrisponda ad un epitopo importante per l'induzione di una efficace risposta immunitaria.

I frammenti di DNA che codificano le porzioni della p185^{neu} di ratto da inserire sono stati ottenuti mediante amplificazione enzimatica del DNA. Per



amplificare questi tratti di cDNA sono stati usati sei oligonucleotidi, di cui il senso è uguale per tutti e corrisponde al primer di T7 (oligonucleotide #11) mentre i cinque antisenso sono stati disegnati per riconoscere il cDNA di ratto nelle opportune posizioni ed hanno alle loro estremità il sito di restrizione per *NheI* (oligonucleotidi #24-#28). Dopo purificazione e digestione con gli enzimi di restrizione *HindIII* e *NheI*, i frammenti amplificati sono stati inseriti nei plasmidi corrispondenti (pCMV3.1H/NhECD1-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD2-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD3-TM-8CpG, pCMV3.1H/NhECD4-TM-8CpG pCMV3.1H/NhECD5-TM-8CpG), digeriti con gli stessi enzimi di restrizione. In questo modo abbiamo ottenuto cinque nuovi plasmidi in grado di codificare proteine chimera di 689 aa, di cui 2 aa (Val-Ser) appartengono al sito di restrizione *NheI* usato per la congiunzione tra il DNA di ratto e quello umano. La presenza di questi due aa rende eteroclitiche sia le porzioni umane che quelle di ratto.

Le proteine chimera differiscono per porzioni decrescenti della p185^{neu} umana e per porzioni crescenti della p185^{neu} di ratto. Il plasmide pCMV3.1H/Nr73-hECD1-TM-8CpG (Fig. 10) codifica 73 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 614 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr153-hECD2-TM-8CpG (Fig. 11) codifica 153 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 534 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr233-hECD3-TM-8CpG (Fig. 12) codifica 233 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 454 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr313-hECD4-TM-8CpG (Fig. 13) codifica 313 aa del dominio extracellulare della p185^{neu} di ratto e 374 aa della p185^{neu} umana. Il plasmide pCMV3.1H/Nr393-hECD5-TM-8CpG (Fig. 14) codifica 393 aa del dominio

extracellulare della p185^{neu} di ratto e 294 aa della p185^{neu} umana. La prova indiretta dell'espressione in membrana delle p185^{neu} chimera uomo/topo codificate da questi plasmidi è stata ottenuta immunizzando i topi con i cinque nuovi plasmidi e con il pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG come controllo positivo. I sieri di tutti i topi vaccinati presentano anticorpi specifici contro la p185^{neu} umana. Inoltre, gli animali vaccinati con i plasmidi codificanti le cinque diverse proteine chimera sono anche protetti verso un inoculo letale di cellule tumorali che esprimono la p185^{neu} umana.

ESEMPI

Esempio1 - costruzione del plasmide pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG

Per costruire il plasmide chimera pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG siamo partiti dal plasmide pCMV-ECD-TM che esprime i domini extracellulare e transmembrana della p185^{neu} di ratto (Amici et al 2000, Gene Ther., 7: 703). Il pCMV-ECD-TM è stato digerito con gli enzimi di restrizione HindIII e XbaI (BioLabs, Beverly, MA) per separare l'inserto dallo scheletro plasmidico.

Digestione di restrizione con l'enzima HindIII:

DNA plasmidico (1 µg/µl)	10 µl
tampone di restrizione 10X (NEB2)	10 µl
HindIII (10U/µl)	5 µl
H ₂ O	<u>75 µl</u>
100 µl volume finale	

La miscela è stata incubata a 37°C per 4 ore e il prodotto di digestione è stato controllato mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% usando

come controlli un marcatore di peso molecolare ed il plasmide non digerito.

Una volta accertata la linearizzazione del plasmide il DNA è stato precipitato aggiungendo alla miscela 1/10 del volume di NaAcetato 3 M a pH 5,2 e 2 volumi di Etanolo assoluto freddo.

Il campione è stato tenuto 20 min. in ghiaccio e poi centrifugato in una minicentrifuga a 14.000 rpm per 12 min. Il pellet è stato lavato tre volte con 1 ml di Etanolo freddo al 70% e quindi è stato essiccato sotto vuoto per 5 min. Il pellet è stato poi risospeso in 84 μ l di H₂O e sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione XbaI.

Digestione di restrizione con l'enzima XbaI:

DNA risospeso in H ₂ O (10 μ g)	84 μ l
tampone di restrizione 10X (NEB2)	10 μ l
BSA 100X (100mg/ml)	1 μ l
XbaI (10U/ml)	<u>5 μl</u>
	100 μ l

La miscela è stata incubata a 37°C per 4 ore e il prodotto di digestione è stato precipitato ed essiccato come è stato descritto precedentemente. Il DNA è stato risospeso in 30 μ l di H₂O.

I due frammenti di DNA corrispondenti allo scheletro plasmidico (pCMV di 4400bp) ed all'inserto (ECD-TM di 2100bp) sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

La banda corrispondente all'inserto è stata tagliata ed il DNA è stato eluito dal gel utilizzando il Qiaquick gel extraction kit della Qiagen Italia.

Parallelamente il nuovo scheletro plasmidico (pCMV3.1H/N-4CpG) in cui inserire il frammento di DNA corrispondente all'ECD-TM della p185 di

ratto, è stato digerito con gli stessi enzimi di restrizione ed è stato eluito dal gel di agarosio.

I frammenti di DNA corrispondenti all'ECD-TM di ratto ed al plasmide linearizzato pCMV3.1H/N-4CpG sono stati usati per ottenere il pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG mediante reazione di ligazione.

Reazione di ligazione:

DNA inserto (rECD-TM) (50 ng/μl)	2 μl
DNA plasmidico linearizzato (pCMV3.1H/N4CpG) (50 ng/μl)	1 μl
Tampone di reazione 10X per la T4 DNA ligasi	1 μl
T4 DNA ligasi (2U/μl)	1 μl
H ₂ O	5 μl
	10 μl

La reazione di ligazione è stata incubata a 16°C per 4 ore.

Il prodotto di ligazione è stato poi utilizzato per trasformare il ceppo batterico di *E. coli* DH5 α. Le cellule batteriche sono state rese competenti con la tecnica del CaCl₂.

Trasformazione del ceppo batterico DH5 α:

Cellule batteriche competenti	100 μl
Prodotto di ligazione	5 μl

Affinché il DNA plasmidico penetri nelle cellule competenti, queste ultime sono state tenute in ghiaccio per 40 min. e sottoposte a shock termico ponendole a 42°C per 1 min. e mezzo e quindi in ghiaccio per altri 2 min.

Dopo aver aggiunto 1 ml di terreno di crescita LB, le cellule batteriche trasformate sono state incubate a 37°C per 1 ora per ripristinare le loro condizioni fisiologiche.



La sospensione cellulare è stata quindi centrifugata a 6000 rpm per 1 min. ed il pellet è stato risospeso in 100 µl di LB.

Le cellule sono state seminate in piastre Petri contenenti terreno selettivo solido (LB con agar + ampicillina 100 µg/ml) e lasciate crescere a 37°C per 1 notte. La presenza di ampicillina permette la crescita solamente delle cellule che contengono il plasmide pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG in cui è presente il gene per la resistenza all'ampicillina.

I cloni ottenuti sono stati analizzati mediante lisi alcalina per individuare quello/i contenenti il plasmide ricombinante pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG.

Per ottenere il plasmide chimera pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cysTM-8CpG, il plasmide pCMV3.1H/N-rECD-TM-4CpG è stato digerito con gli enzimi di restrizione BstEII e XbaI per eliminare il 2° subdominio cisteinico insieme al dominio transmembrana della p185^{neu} di ratto. Contemporaneamente è stato digerito con gli stessi enzimi il plasmide pCMV3.1hECD-TM-4CpG per isolare il frammento di DNA che corrisponde al 2° subdominio cisteinico ed al dominio transmembrana del gene umano.

Digestione con BstEII:

DNA plasmidico (1 µg/µl)	10 µl
Tampone di restrizione 10X (NEB3)	10 µl
BstEII (10U/µl)	5 µl
H ₂ O	<u>75 µl</u>
100 µl volume finale	

La miscela è stata incubata a 60°C per 4 ore.

La digestione di restrizione con XbaI, il recupero dei frammenti da

utilizzare per il clonaggio, la reazione di ligazione e la trasformazione delle cellule competenti sono stati descritti precedentemente.

Ottenuto il plasmide chimera pCMV3.1H/N-r1[°]cys-h2[°]cysTM-8CpG è stato analizzato mediante il sequenziamento di Sanger utilizzando il sequenziatore automatico della Applied Biosystem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, per verificare la corretta inserzione del frammento di DNA corrispondente al 2° subdominio cisteinico ed al dominio transmembrana del gene umano.

Esempio 2 – test in vivo

Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi femmina del ceppo Balb/cAnCr (H-2d) di circa sette settimane.

Gli animali provengono dai Laboratori Charles River (Calco, MI, Italia), dove sono allevati in condizioni asettiche ed in conformità a quanto stabilito dalla Comunità Europea.

Somministrazione intramuscolo seguita da elettroporazione in vivo

Per evitare contrazioni indesiderate del muscolo tibiale, prima della vaccinazione ogni topo è stato anestetizzato mediante l'inoculo i.p. di 300 µl di avertina, composta con 0.58 g di tribromoetano (Sigma-Aldrich) e 310 µl di Tert-Amyl alcohol (Aldrich) sciolti in 39.5 ml di H₂O deionizzata. Tutti i topi sono quindi stati rasati a livello del muscolo tibiale, in modo da rendere più facile la vaccinazione.

Gli animali sono stati immunizzati mediante l'inoculo, a livello di entrambi i muscoli antero-tibiali, di 40 µl di soluzione contenente 50µg di DNA.

La miscela contenente il DNA è stata preparata poco prima dell'uso, in

accordo con le indicazioni della Dott.ssa F. Pericle (Valentis, Inc., The Woodlands, Texas, USA). Tale soluzione contiene rispettivamente: DNA plasmidico alla concentrazione di 1.25 mg/ml, sale sodico poli-L-glutammato alla concentrazione di 6 mg/ml (Sigma-Aldrich, S.r.l., Milano, Italia), cloruro di sodio (150 mM) (Fluka, BioChemika, Buchs, Switzerland) ed acqua distillata priva di endotossine (Nucleare Free Water, Promega Corporation) per raggiungere il volume finale di 1 ml.

Dopo circa 5 minuti dall'inoculo, l'area trattata è stata sottoposta ad elettroporazione, mediante due impulsi elettrici dell'intensità di 375 V/cm^2 e della durata di 25 ms l'uno, usando l'elettroporatore Electro Square Porator (T820; BTX, San Diego, CA, USA). Gli impulsi elettrici transcutanei sono stati applicati mediante l'uso di due elettrodi quadrangolari d'acciaio posti a 3 mm l'uno dall'altro, ai lati di ogni zampa. L'immunizzazione genica mediante elettroporazione è stata eseguita due volte per ogni animale 21 e 7 gg prima di inoculare le cellule tumorali.

Inoculo delle cellule tumorali

I topi sono stati inoculati nel fianco sinistro con 0.2 ml di una sospensione contenente 2×10^5 cellule D2F2/E2. Tali cellule derivano da un tumore mammario insorto spontaneamente in un nodulo alveolare iperplastico di topo BALB/c e sono trasfettate con la p185 di uomo in modo da esprimerla in membrana ad alti livelli.

Valutazione della crescita tumorale in vivo

La crescita tumorale è stata valutata ogni settimana mediante palpazione, e la dimensione dei tumori è stata misurata lungo due diametri perpendicolari attraverso un calibro. Masse neoplastiche di dimensione

maggiore di 3 millimetri sono considerate tumori.

La crescita tumorale è stata seguita per 100 giorni dall'inoculo del tumore o fino alla crescita del tumore oltre i 10 millimetri di diametro, momento in cui gli animali sono stati sacrificati.

Tabella

Topi: BALB/c femmine

Tumore: D2F2-E2 esprime la p185^{neu} umana

plasmidi	n° topi	protezione	anticorpi
pCMV3.1H/N-8CpG	5	0%	-
pCMV3.1H/N-hECD-TM-8CpG	5	100%	+++
pCMV3.1H/N-hECD1-TM-8CpG	5	100%	-
pCMV3.1H/N-hECD2-TM-8CpG	5	100%	-
pCMV3.1H/N-hECD3-TM-8CpG	5	100%	+
pCMV3.1H/N-hECD4-TM-8CpG	5	100%	++
pCMV3.1H/N-hECD5-TM-8CpG	5	60%	-
pCMV3.1H/N-hECD6-TM-8CpG	5	0%	-
pCMV3.1H/N-hECD7-TM-8CpG	5	0%	-
pCMV3.1H/N-r1°cys-h2°cys-TM-8CpG	5	100%	+++

Elenco oligonucleotidi sintetizzati ed usati per la costruzione dei plasmidi

#1. AccIII-TAA-4CpG-erbB2 senso 71 nt

5'CCGGAAGTAAATAATCGACGTTCAAATAATCGACGTTCAAA

TAATCGACGTTCAAATAATCGACGTTCAAT 3'

#2. XbaI-TAA-4CpG-erbB2 antisenso 71 nt

5'CTAGATTGAACGTCGATTATTTGAACGTCGATTATTTGAACG
TCGATTATTTGAACGTCGATTATTTACTT 3'

#3. AccIII-TAA-4noCpG-erbB2 senso 71 nt

5'CCGGAAGTAAATAATAGAGCTTCAAATAATAGAGCTTCAAA
TAATAGAGCTTCAAATAATAGAGCTTCAAT 3'

#4. XbaI-TAA-4noCpG-erbB2 antisenso 71 nt

5'CTAGATTGAAGCTCTATTATTTGAAGCTCTATTATTTGAAGC
TCTATTATTTGAAGCTCTATTATTTACTT 3'

#5. HindIII-NheI senso 27nt

5' CTAGGAAGCTTGTTTAACTTGCTAGCT 3'

#6. HindIII-NheI antisenso 27 nt

5'AGCTAGCTAGCAAGTTAAACAAGCTTC 3'

#7. XbaI-4CpG-neu senso 68 nt

5'CTAGATAATCGACGTTCAAATAATCGACGTTCAAATAATCG
ACGTTCAAATAATCGACGTTCAAGTTT 3'

#8. PmeI-CpG-neu antisenso 64 nt

5'AAACTTGAACGTCGATTATTTGAACGTCGATTATTTGAACGT
CGATTATTTGAACGTCGATTAT 3'

#9. XbaI-4noCpG-neu senso 68 nt

5'CTAGATAATAGAGCTTCAAATAATAGAGCTTCAAATAATAG
AGCTTCAAATAATAGAGCTTCAAGTTT 3'

#10. PmeI-4noCpG-neu antisenso 64 nt

5'AAACTTGAAGCTCTATTATTTGAAGCTCTATTATTTGAAGCT

CTATTATTTGAAGCTCTATTAT 3'

#11. T7 primer

5'TAATACGACTCACTATAGGG 3'

#12. BstEII-neuleader antisense 32 nt

5'GGCCGGTTACCCGCGATTCCGGGGGGGCAGGAG 3'

#13. hECD1-TM-senso-NheI 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCCTGTCCTTCCTGCAGGATATCC 3'

#14. hECD2-TM-senso-NheI 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCGGAGGGGTCTTGA^TCCAGCGGA 3'

#15. hECD3-TM-senso-NheI 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCCTGCCCAGTACTGCTGCCATG 3'

#16. hECD4-TM-senso-NheI 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCTGCACCCTCGTCTGCCCCCTGC 3'

#17. hECD5-TM-senso-NheI 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCCCGCTCCAGCCAGAGCAGCTCC 3'

#18. hECD6-TM-senso-NheI 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCAACACCCACCTCTGCTTCGTGC 3'

#19. hECD7-TM-senso-NheI 35 nt

CCGGCTAGCTAGCCCCAGGGAGTATGTGAATGCCA 3'

#20. pcDNA3.1/BGH Reverse primer 20 nt

5'TAGAAGGCACAGTCGAGGCT 3'

#21. NheI-neuleader-antisense 43 nt

5'CCGGCTAGCTAGCCGCGATTCCGGGGGGGCAGGAGGGCGAGG
AG 3'

#22. His-myc-senso-noNheI 69 nt

5'CTAGGCATCATCATCATCATAATGGTCATACCGGTGAAC
AAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGG 3'

#23. His-myc-antisense-NheI 69 nt

5'CTAGCCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCACCGGTA
TGACCATTATGATGATGATGATGATGC 3'

#24. NheI-73neu antisense 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCGCTGGCATTGGCAGGCACGTAG 3'

#25. NheI-153neu antisense 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCCAGGATCTCTGTGAGACTTCGA 3'

#26. NheI-233neu antisense 35 nt

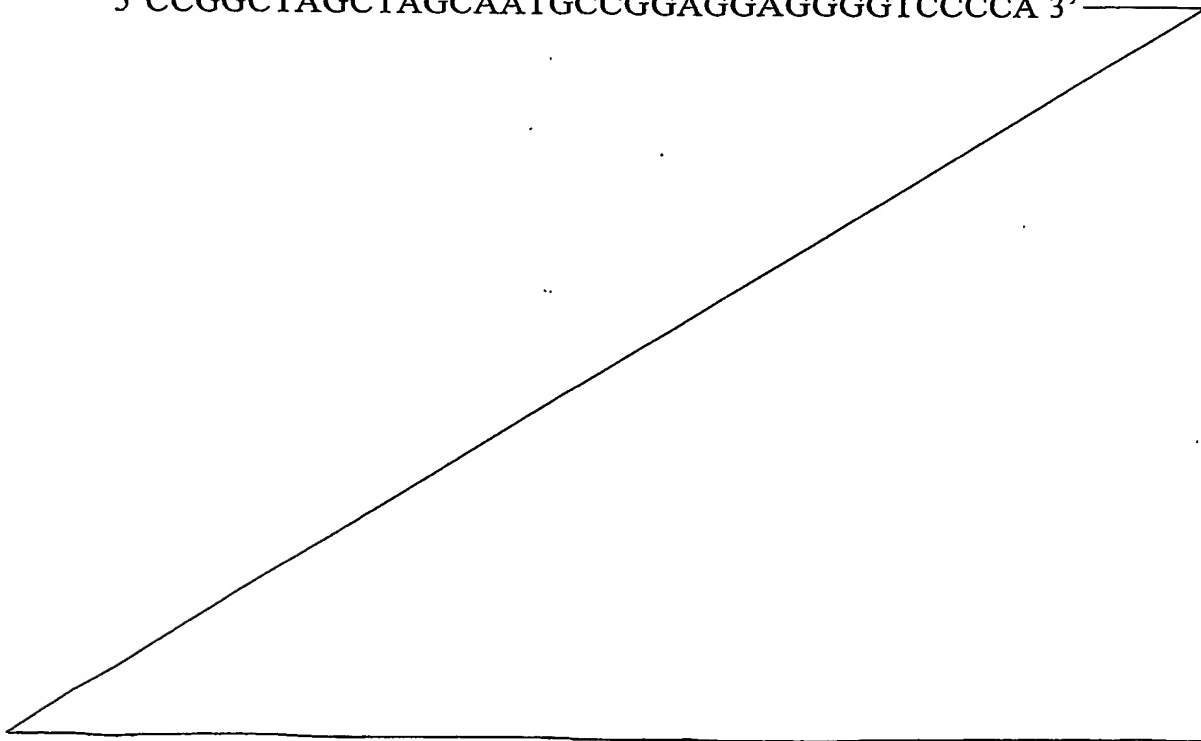
5'CCGGCTAGCTAGCGCCCTTGCACCGGGCACAACCA 3'

#27. NheI-313neu antisense 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCTCCCACTTCCGTAGACAGGTAG 3'

#28. NheI-393neu antisense 35 nt

5'CCGGCTAGCTAGCAATGCCGGAGGAGGGGTCCCCA 3'



LISTA DI SEQUENZE

<110> INDENA S.p.A.

<120> DNA CODIFICANTE p185^{neu} E SUOI USI TERAPEUTICI

<130> 7118M

<160> 42

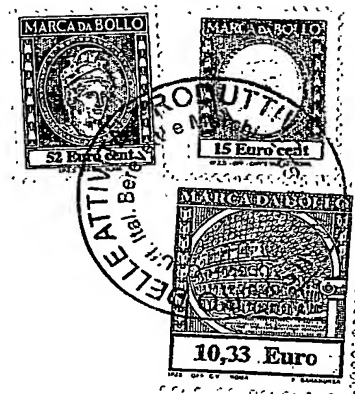
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 922

<212> DNA

<213> human/rat



<400> 1
ccgggcccga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tggcgccgct gggggttcct 60
cctgcgccctc ctgccccccg gaatcgcggg ttacctatac atctcagcat ggccggacag 120
cctgcctgac ctccagcgtct tccagaacct gcaagtaatc cggggacgaa ttctgcacaa 180
tgggcgctac tgcctgaccc tgcaagggt gggcatcagc tggctggggc tgcgctcact 240
gagggaactg ggcagtggac tggccctcat ccaccataac acccacctct gcttcgtgca 300
cacggtgccc tgggaccagc tctttcgga cccgcaccaa gctctgctcc aactgocaa 360
ccggccagag gacgagtgtg tgggcgagg cctggcctgc caccagctgt gcgcccagg 420
gcactgctgg ggtccagggc ccaccagtg tgtcaactgc agccagttcc ttcggggcca 480
ggagtgcgtg gaggaatgcc gactactgca ggggctcccc agggagtatg tgaatgccag 540
gcactgtttg ccgtgccacc ctgagtgtca gcccagaat ggctcagtga cctgttttg 600
accggagggt gaccagtgtg tggcctgtgc ccactataag gacctccct tctgcgtggc 660
ccgctgcccc agcgtgtga aacctgacct ctctacatg ccatctgga agtttccaga 720
tgaggagggc gcatgccagc cttgccccat caactgcacc cactcctgtg tggacctgga 780
tgacaagggc tgccccgccg agcagagagc cagccctctg acgtccatcg tctctcggt 840

ggttggcatt ctgctggctg tggctctggg ggtgggtcttt gggatcctca tcaagcgacg 900
gcagcagaag atccggaagt aa 922

<210> 2

<211> 2083

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 2

cggggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcgggc tgggtgccgt ggggggttcct 60
cctcgccctc ctgcccccg gaatcgcggg caccgaagtg tgtaccggca cagacatgaa 120
gttgcggtc cctgccagtc ctgagacca cctggacatg ctccgccacc tgtaccaggg 180
ctgtcaggta gtgcagggca acttgagct tacctacgtg cctgccaatg ccagcctctc 240
attcctgcag gacatccagg aagttcaggg ttacatgctc atcgctcaca accaggtgaa 300
gcgcgtccca ctgcaaaggc tgcgcacgt gagagggacc cagctctttg aggacaagta 360
tgccctggct gtgctagaca accgagatcc tcaggacaat gtcgccgct ccaccccagg 420
cagaacccca gaggggctgc gggagctgca gcttcgaagt ctacagaga tctgaaggg 480
aggagtittg atccgtggga accctcagct ctgctaccag gacatggttt tgtggaagga 540
cgtcttccgc aagaataacc aactggctcc tgtgatata gacaccaatc gttcccgggc 600
ctgtccacct tgtgcccccg cctgcaaaga caatcactgt tggggtgaga gtccggaaga 660
ctgtcagatc ttgactggca ccatctgtac cagtggttgt gcccggtgca agggccggct 720
gcccactgac tgctgccatg agcagtgtgc cgcaggctgc acgggccccca agcattctga 780
ctgcctggcc tgcctccact tcaatcatag tggatatctgt gagctgcact gccagccct 840
cgtcacctac aacacagaca cttttgagtc catgcacaac cctgagggtc gctacacctt 900
tgggtgccagc tgcgtgacca cctgccccta caactacctg tctacggaag tgggatoctg 960
cactctggtg tgtccccga ataaccaaga ggtaacagct gaggacggaa cacagcgttg 1020
tgagaaatgc agcaagccct gtgctcgagt gtgctatggt ctgggcatgg agcaccttcg 1080
aggggcgagg gccatcacca gtgacaatgt ccaggagttt gatggctgca agaagatctt 1140
tgggagcctg gcatttttgc cggagagctt tgatggggac cctcctccg gcattgctcc 1200
gctgaggcct gagcagctcc aagtgttcga aaccctggag gagatcacag gttacctata 1260
catctcagca tggccggaca gcctgcctga cctcagcgtc ttccagaacc tgcaagtaat 1320
ccggggacga attctgcaca atggcgctc ctcgctgacc ctgcaagggc tgggcatcag 1380

ctggctgggg	ctgcgctcac	tgagggaact	gggcagtgga	ctggccctca	tccaccataa	1440
caccacctc	tgcttcgtgc	acacggtgcc	ctgggaccag	ctctttcgga	acccgcacca	1500
agctctgctc	cacactgcc	accggccaga	ggacgagtgt	gtgggogagg	gcctggcctg	1560
ccaccagctg	tgcgcccgag	ggcactgctg	gggtccagg	cccacccagt	gtgtcaactg	1620
cagccagttc	cttcggggcc	aggagtgcgt	ggaggaatgc	cgagtactgc	aggggctccc	1680
cagggagtat	gtgaatgcc	ggcactgttt	gccgtgccac	cctgagtgtc	agccccagaa	1740
tggctcagt	acctgttttg	gaccggaggc	tgaccagtgt	gtggcctgtg	cccactataa	1800
ggaccctccc	ttctgcgtgg	cccgtgccc	cagcgggtgtg	aaacctgacc	tctcctacat	1860
gcccctctgg	aagtttccag	atgaggagg	cgcatgccag	ccttgcccca	tcaactgcac	1920
ccactcctgt	gtggacctgg	atgacaagg	ctgccccgcc	gagcagagag	ccagccctct	1980
gacgtccatc	gtctctgcgg	tggttgcat	tctgctggtc	gtggctcttg	gggtggtctt	2040
tgggatcctc	atcaagcgac	ggcagcagaa	gatccggaag	taa		2083

<210> 3

<211> 1939

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 3

ccgggcccga	gccgcaatga	tcatcatgga	gctggcggcc	tggtgccgct	gggggttcct	60
cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcgcggc	tagcctgtcc	ttcctgcagg	atatccagga	120
ggtgcagggc	taogtgotca	tcgctcaca	ccaagtgagg	cagggtccac	tgagaggct	180
gcggattgtg	cgaggcaccc	agctctttga	ggacaactat	gccctggccg	tgctagacaa	240
tggagaccgc	ctgaacaata	ccaccctgt	cacaggggcc	tcccaggag	gcctgcggga	300
gctgcagctt	cgaagcctca	cagagatctt	gaaaggagg	gtcttgatcc	agcggaacc	360
ccagctctgc	taccaggaca	cgattttgtg	gaaggacatc	ttccacaaga	acaaccagct	420
ggctctcaca	ctgatagaca	ccaaccgctc	tcgggcctgc	cacccctgtt	ctccgatgtg	480
taagggtctc	cgctgctggg	gagagagtto	tgaggattgt	cagagcctga	cgcgactgt	540
ctgtgccggt	ggctgtgccc	gctgcaagg	gccactgccc	actgactgct	gcatgagca	600
gtgtgctgcc	ggctgcacgg	gcccgaagca	ctctgactgc	ctggcctgcc	tccacttcaa	660
ccacagtggc	atctgtgagc	tgactgccc	agccctggto	acctacaaca	cagacacgtt	720
tgagtccatg	cccaatccc	agggccggt	tacattcggc	gccagctgtg	tgactgcctg	780

tccctacaac tacctttcta cggacgtggg atcctgcacc ctogtctgcc cctgcacaa	840
ccaagagggtg acagcagagg atggaacaca gcggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc	900
cogagtgtgc tatggtctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc	960
caatatccag gagtttgctg gctgcaagaa gatctttggg agcctggcat ttctgccgga	020
gagctttgat ggggaccag cctccaacac tgccccgctc cagccagagc agctccaagt	080
gtttgagact ctggaagaga tcacaggta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct	140
gcctgacctc agcgtcttcc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgcacaatgg	1200
cgcctactcg ctgaccctgc aagggtctgg catcagctgg ctggggctgc gctcaactgag	1260
ggaactgggc agtggactgg cctcatcca ccataacacc cacctctgct tctgtcacac	1320
ggtgccctgg gaccagctct ttcggaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaacgg	1380
gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggctgccac cagctgtgeg cccgagggca	1440
ctgctgggggt ccagggccca ccagtggtgt caactgcagc cagttccttc ggggccagga	1500
gtgctgtggag gaatgccgag tactgcaggg gctccccagg gagtatgtga atgccaggca	1560
ctgtttgccg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgcct gttttggacc	1620
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgcca ctataaggac cctcccttct gcgtggcccg	1680
ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgcc atctggaagt ttccagatga	1740
ggagggcgca tgccagcctt gccccatcaa ctgcaccac tcctgtgtgg acctggatga	1800
caagggtgc cccgccgagc agagagccag ccctctgacg tccatcgtct ctgcggtggt	1860
tggcattctg ctggtcgtgg tottgggggt ggtctttggg atcctcatca agcgacggca	1920
gcagaagatc cggaagtaa	1939

<210> 4

<211> 1699

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 4

ccggggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tgggtgccgct gggggttcct	60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgcggc tagcggaggg gtcttgatcc agcggaaacc	120
ccagctctgc taccaggaca cgattttgtg gaaggacatc ttccacaaga acaaccagct	180
ggctctcaca ctgatagaca ccaaccgctc tcgggcctgc caccctgtt ctccgatgtg	240
taagggtctc cgctgctggg gagagagttc tgaggattgt cagagcctga cgcgcactgt	300

ctgtgccggt ggctgtgccc gctgcaaggg gccactgccc actgactgct gccatgagca 360
gtgtgctgcc ggctgcacgg gcccacagca ctctgactgc ctggcctgcc tccacttcaa 420
ccacagtggc atctgtgagc tgcactgccc agccctgggc acctacaaca cagacacgtt 480
tgagtccatg cccaatcccg agggccggta tacattcggc gccagctgtg tgactgcctg 540
tccctacaac tacctttcta cggacgtggg atcctgcacc ctgctctgcc ccctgcacaa 600
ccaagagggt acagcagagg atggaacaca gcggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc 660
ccgagtgtgc tatggtctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc 720
caatatccag gagtttgctg gctgcaagaa gatctttggg agcctggcat ttctgccgga 780
gagctttgat ggggacccag cctccaacac tgccccgctc cagccagagc agctccaagt 840
gtttgagact ctggaagaga tcacaggta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct 900
gcctgacctc agcgtcttcc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgcacaatgg 960
cgcctactcg ctgaccctgc aagggtctgg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag 1020
ggaactgggc agtggactgg cctcatcca ccataacacc cactctgct tcgtgcacac 1080
ggtgccctgg gaccagctct ttccgaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaacgg 1140
gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggctgccac cagctgtgcg cccgagggca 1200
ctgctgggggt ccagggccca ccagtgtgt caactgcagc cagttccttc ggggccagga 1260
gtgcgtggag gaatgccgag tactgcaggg gctcccagg gagtatgtga atgccaggca 1320
ctgtttgcgg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgcact gttttggacc 1380
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgcca ctataaggac cctcccttct gcgtggcccg 1440
ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgccc atctggaagt ttccagatga 1500
ggagggcgca tgccagcctt gcccacatcaa ctgcacccac tcctgtgtgg acctggatga 1560
caagggtgc cccgccgagc agagagccag ccctctgacg tccatcgtct ctgcggtggt 1620
tggcattctg ctggtcgtgg tcttgggggt ggtctttggg atcctcatca agcgacggca 1680
gcagaagatc cggaaagtaa 1699

<210> 5
<211> 1459
<212> DNA
<213> human/rat



<400> 5
ccgggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tgggtgccgt gggggttcct 60

```

cctcgccctc ctgccccccg gaatcgcggc tagcctgccc actgactgct gccatgagca 120
gtgtgctgcc ggctgcacgg gcccacagca ctctgactgc ctggcctgcc tccacttcaa 180
ccacagtggc atctgtgagc tgcactgccc agccctgggc acctacaaca cagacacggt 240
tgagtccatg cccaatcccg agggccggta tacattcggc gccagctgtg tgactgcctg 300
tccctacaac tacctttcta cggacgtggg atcctgcacc ctgctctgcc ccctgcacaa 360
ccaagaggtg acagcagagg atggaacaca gcggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc 420
ccgagtgtgc tatggtctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc 480
caatatccag gagtttctgt gctgcaagaa gatctttggg agcctggcat ttctgccgga 540
gagctttgat ggggacccag cctccaacac tgccccgctc cagccagagc agctccaagt 600
gtttgagact ctggaagaga tcacaggtta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct 660
gcctgacctc agcgtcttcc agaacctgca agtaatccgg ggacgāatc tgcacaatgg 720
cgctactcg ctgacctgc aagggtctgg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag 780
ggaactgggc agtggactgg ccctcatcca ccataacacco cacctctgct tctgacacac 840
ggtgccctgg gaccagctct ttcggaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaaccg 900
gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggcctgccac cagctgtgcg cccgagggca 960
ctgctggggg ccagggccca ccagtggtg caactgcagc cagttccttc ggggccagga 1020
gtgcgtggag gaatgcccag tactgcaggg gctccccagg gagtatgtga atgccaggca 1080
ctgtttgccg tgccacctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgcact gttttggacc 1140
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgcca ctataaggac cctcccttct gcgtggcccg 1200
ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgccc atctggaagt ttccagatga 1260
ggagggcgca tgccagcctt gcccacatca ctgcacccac tcctgtgtgg acctggatga 1320
caagggctgc cccgcogagc agagagccag ccctctgacg tccatcgtct ctgcgggtgt 1380
tggcattctg ctggtcgtgg tcttgggggt ggtctttggg atcctcatca agcgacggca 1440
gcagaagatc cggaagtaa 1459

```

<210> 6

<211> 1219

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 6

```

ccgggcccga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tgggtccgct gggggttcct 60

```

```

cctcgccctc ctgccccccg gaatcgcggc tagctgcacc ctgctctgcc ccctgcacaa 120
ccaagagggtg acagcagagg atggaacaca gcggtgtgag aagtgcagca agccctgtgc 180
ccgagtgtgc tatggtctgg gcatggagca cttgcgagag gtgagggcag ttaccagtgc 240
caatatccag gagtttctg gctgcaagaa gatctttggg agcctggcat ttctgccgga 300
gagctttgat ggggacccag cctccaacac tgccccgctc cagccagagc agctccaagt 360
gtttgagact ctggaagaga tcacaggta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct 420
gcctgacctc agcgttcttc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgcacaatgg 480
cgcctactcg ctgaccctgc aagggtctgg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag 540
ggaactgggc agtggactgg ccctcatcca ccataacacc cacctctgct tcgtgcacac 600
ggtgccctgg gaccagctct ttcggaacct gcaccaagct ctgctcca_ga ctgccaaccg 660
gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggctgccac cagctgtggeg cccgagggca 720
ctgctggggt ccagggccca ccagtggtgt caactgcagc cagttccttc ggggccagga 780
gtgctgggag gaatgccgag tactgcaggg gctcccagg gagtatgtga atgccaggca 840
ctgtttgccg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgcct gttttggacc 900
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgcccc ctataaggac cctcccttct gcgtggccccg 960
ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgccc atctggaagt ttccagatga 1020
ggagggcgca tgccagcctt gccccatcaa ctgcacccac tcctgtgtgg acctggatga 1080
caagggtgc cccgccgagc agagagccag ccctctgacg tccatcgtct ctgcggtggt 1140
tggcattctg ctggtcgtgg tcttgggggt ggtctttggg atcctcatca agcgacggca 1200
gcagaagatc cggaagtaa 1219

```

<210> 7

<211> 979

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 7

```

ccgggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcgggc tgggtccgct gggggttcct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgcggc tagccccgctc cagccagagc agctccaagt 120
gtttgagact ctggaagaga tcacaggta cctatacatc tcagcatggc cggacagcct 180
gcctgacctc agcgttcttc agaacctgca agtaatccgg ggacgaattc tgcacaatgg 240
cgcctactcg ctgaccctgc aagggtctgg catcagctgg ctggggctgc gctcactgag 300

```

ggaactgggc agtggactgg ccctcatcca ccataacacc cacctctgct tegtgcacac 360
 ggtgccctgg gaccagctct ttcggaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg 420
 gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggccctgccac cagctgtgcg cccgagggca 480
 ctgctgggggt ccagggccca cccagtgtgt caactgcagc cagttccttc ggggccagga 540
 gtgcgtggag gaatgccgag tactgcaggg gctccccagg gagtatgtga atgccaggca 600
 ctgtttgccg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgcact gttttggacc 660
 ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgccca ctataaggac cctcccttct gcgtggcccg 720
 ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgcc atctggaagt ttccagatga 780
 ggagggcgca tgccagcctt gcccacatcaa ctgcaccac tcctgtgtgg acctggatga 840
 caagggctgc cccgccgagc agagagccag ccctctgacg tccatcgtct ctgcggtgggt 900
 tggcattctg ctggctgtgg tcttgggggt ggtctttggg atcctcatca agcgacggca 960
 gcagaagatc cggaagtaa 979

<210> 8

<211> 739

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 8

ccgggcccga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tgggtgccgt gggggttcct 60
 cctcgccctc ctgcccccg gaatcgcggc tagcaacacc cacctctgct tegtgcacac 120
 ggtgccctgg gaccagctct ttcggaaccc gcaccaagct ctgctccaca ctgccaaccg 180
 gccagaggac gagtgtgtgg gcgagggcct ggccctgccac cagctgtgcg cccgagggca 240
 ctgctgggggt ccagggccca cccagtgtgt caactgcagc cagttccttc ggggccagga 300
 gtgcgtggag gaatgccgag tactgcaggg gctccccagg gagtatgtga atgccaggca 360
 ctgtttgccg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgcact gttttggacc 420
 ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgccca ctataaggac cctcccttct gcgtggcccg 480
 ctgccccagc ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgcc atctggaagt ttccagatga 540
 ggagggcgca tgccagcctt gcccacatcaa ctgcaccac tcctgtgtgg acctggatga 600
 caagggctgc cccgccgagc agagagccag ccctctgacg tccatcgtct ctgcggtgggt 660
 tggcattctg ctggctgtgg tcttgggggt ggtctttggg atcctcatca agcgacggca 720
 gcagaagatc cggaagtaa 739

<210> 9
<211> 499
<212> DNA
<213> human/rat

<400> 9
ccggggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcgggcc tgggtgccgct gggggttcct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgcggc tagccccagg gagtatgtga atgccaggca 120
ctgtttgccg tgccaccctg agtgtcagcc ccagaatggc tcagtgcact gttttggacc 180
ggaggctgac cagtgtgtgg cctgtgccc ctataaggac cctcccttct gcgtggccccg 240
ctgccccage ggtgtgaaac ctgacctctc ctacatgccc atctggaaagt ttccagatga 300
ggagggcgca tgccagcctt gccccatcaa ctgcaccac tctgtgtgg acctggatga 360
caagggtgc cccgccgagc agagagccag ccctctgacg tccatcgtct ctgcggtggt 420
tggcattctg ctggtcgtgg tcttgggggt ggtctttggg atcctcatca agcgacggca 480
gcagaagatc cggaagtaa

<210> 10
<211> 2086
<212> DNA
<213> human/rat



<400> 10
ccggggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcgggcc tgggtgccgct gggggttcct 60
cctcgccctc ctgccccccg gaatcgcggg caccgaagtg tgtaccggca cagacatgaa 120
gttgcggtc cctgccagtc ctgagacca cctggacatg ctccgccacc tgtaccaggg 180
ctgtcaggta gtgcagggca acttggagct tacctacgtg cctgccaatg ccagegctag 240
cctgtccttc ctgcaggata tccaggaggt gcagggtac gtgctcatcg ctcaaacca 300
agtgaggcag gtccactgc agaggctgog gattgtgcga ggcaccagc tctttgagga 360
caactatgcc ctggccgtgc tagacaatgg agaccgctg aacaatacca ccctgtcac 420
aggggcctcc ccaggaggcc tgcgggagct gcagcttoga agcctcacag agatcttgaa 480
aggaggggtc ttgatccagc ggaaccccca gctctgctac caggacacga ttttgtggaa 540
ggacatcttc cacaagaaca accagctggc tctcacactg atagacacca accgctctcg 600
ggcctgccac ccctgttctc cgatgtgtaa gggctcccg tgctggggag agagttctga 660

```

ggattgtcag agcctgacgc gcactgtctg tgccggtggc tgtgcccgt gcaaggggcc 720
actgcccact gactgctgcc atgagcagtg tgctgccggc tgcacgggcc ccaagcactc 780
tgactgcctg gcctgcctcc acttcaacca cagtggcatc tgtgagctgc actgcccagc 840
cctggtcacc tacaacacag aacggttga gtccatgccc aatcccagg gccggtatac 900
attcggcgcc agctgtgtga ctgctgtcc ctacaactac ctttctacgg acgtgggac 960
ctgcaccctc gtctgcccc tgcacaacca agaggtgaca gcagaggatg gaacacagcg 1020
gtgtgagaag tgcagcaagc cctgtgccc agtgtgctat ggtctgggca tggagcactt 1080
gogagaggtg agggcagtta ccagtgccaa tatccaggag tttgctggct gcaagaagat 1140
ctttggggagc ctggcatttc tgccggagag ctttgatggg gaccagcct ccaacactgc 1200
cccgtccag ccagagcagc tccaagtgtt tgagactctg gaagagatca caggttacct 1260
atacatctca gcatggccgg acagcctgcc tgacctcagc gtcttccaga acctgcaagt 1320
aatccgggga cgaattctgc acaatggcgc ctactcgtg accctgcaag ggctgggcat 1380
cagctggctg gggctgcgt cactgagga actgggcagt ggactggccc tcatccacca 1440
taacaccac ctctgcttcg tgcacacggt gccctgggac cagctctttc ggaacccgca 1500
ccaagctctg ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tgtgtgggag agggcctggc 1560
ctgccaccag ctgtgcgccc gagggcactg ctgggggtcca gggcccaccc agtgtgtcaa 1620
ctgcagccag ttccttcggg gccaggagtg cgtggaggaa tgccgagtac tgcaggggct 1680
cccaggag tatgtgaatg ccaggcactg tttgccgtgc caccctgagt gtcagcccca 1740
gaatggctca gtgacctgtt ttggaccgga ggctgaccag tgtgtggcct gtgcccacta 1800
taaggacct ccttctgctg tgcccgctg cccagcgggt gtgaaacctg acctctccta 1860
catgcccac tggaagtttc cagatgagga gggcgcatgc cagccttgcc ccatcaactg 1920
caccactcc tgtgtggacc tggatgacaa gggctgcccc gccgagcaga gagccagccc 1980
tctgacgtcc atcgtctctg cgggtggttg cattctgctg gtcgtggtct tgggggtggt 2040
ctttgggac ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa 2086

```

<210> 11

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 11

ccgggcccga gccgcaatga tcatcatgga gctggcgcc	tggtgccgct gggggttcct	60
cctcgccctc ctgcccccg gaatcgcgga caccgaagt	tgtaccggca cagacatgaa	120
gttgcggtc cctgccagtc ctgagacca cctggacatg	ctccgccacc tgtaccagg	180
ctgtcaggta gtgcaggga acttgagct tacctacgtg	cctgccaatg ccagcctctc	240
attcctgcag gacatccagg aagttcagg ttacatgctc	atcgctcaca accagggtgaa	300
gcgcgtccca ctgcaaaggc tgcgcatcgt gagagggacc	cagctctttg aggacaagta	360
tgccctggct gtgctagaca accgagatcc tcaggacaat	gtcgccgcct ccacccagg	420
cagaacccca gaggggctgc gggagctgca gcttcgaagt	ctcacagaga tcctggctag	480
cggaggggtc ttgatccagc ggaacccca gctctgctac	caggacacga ttttgtggaa	540
ggacatcttc cacaagaaca accagctggc tctcacactg	atagacacca accgctctcg	600
ggcctgccac ccctgttctc cgatgtgtaa gggctccgc	tgctggggag agagtctga	660
ggattgtcag agcctgacgc gactgtctg tgccgggtgc	tgtgcccgct gcaaggggc	720
actgccact gactgctgcc atgagcagtg tgctgcggc	tgacggggc ccaagcactc	780
tgactgcctg gcctgcctcc acttcaacca cagtggcatc	tgtgagctgc actgccagc	840
cctggtcacc tacaacacag acacgtttga gtccatgcc	aatcccgagg gccgtatac	900
attcgggcc agctgtgtga ctgcctgtcc ctacaactac	ctttctacgg acgtgggatc	960
ctgcaccctc gtctgcccc tgcacaacca agaggtgaca	gcagaggatg gaacacagcg	1020
gtgtgagaag tgcagcaagc cctgtgccc agtgtgctat	ggtctgggca tggagcactt	1080
gcgagagggtg agggcagtta ccagtgccaa tatccaggag	tttgctggct gcaagaagat	1140
ctttgggagc ctggcatttc tgccggagag ctttgatggg	gaccagcct ccaacactgc	1200
cccgtccag ccagagcagc tccaagtgtt tgagactctg	gaagagatca caggttacct	1260
atacatctca gcatggccg acagcctgcc tgacctcagc	gtcttcaga acctgcaagt	1320
aatccggga cgaattctgc acaatggcg ctactcgctg	accctgcaag ggctgggcat	1380
cagctggctg gggctgcgt cactgaggga actgggcagt	ggactggccc tcatccacca	1440
taacaccac ctctgcttcg tgcacacggt gccctgggac	cagctcttc ggaacccgca	1500
ccaagctctg ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag	tgtgtggcg agggcctggc	1560
ctgccaccag ctgtgcgcc gagggcactg ctgggtcca	gggccacc agtgtgtcaa	1620
ctgcagccag ttccttcggg gccaggagt cgtggaggaa	tgccgagtac tgcaggggct	1680
ccccaggag tatgtgaatg ccaggcactg tttgccgtgc	caccctgagt gtcagccca	1740
gaatggctca gtgacctgt ttggaccgga ggctgaccag	tgtgtggcct gtgccacta	1800
taaggacct ccctctgcg tggcccgctg cccagcggt	gtgaaacctg acctctcta	1860

catgcccato	tggaagtttc	cagatgagga	gggcgcgatgc	cagccttgcc	ccatcaactg	1920
caccactcc	tgtgtggacc	tgatgacaa	gggctgcccc	gccgagcaga	gagccagccc	1980
tctgacgtcc	atcgtctctg	cggtggttg	cattctgctg	gtcgtggtct	tgggggtggt	2040
ctttgggatc	ctcatcaagc	gacggcagca	gaagatccgg	aagtaa		2086

<210> 12

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 12

ccgggcccga	gccgcaatga	tcacatcatgga	gctggcggcc	tggtgcccgt	gggggttcct	60
cctcgccctc	ctgccccccg	gaatcgccgg	cacccaagtg	tgtaccggca	cagacatgaa	120
gttgccgctc	cctgccagtc	ctgagaccca	cctggacatg	ctccgccacc	tgtaccaggg	180
ctgtcaggta	gtgcagggca	acttgagct	tacctacgtg	cctgccaatg	ccagcctctc	240
attcctgcag	gacatccagg	aagttcaggg	ttacatgctc	atcgctcaca	accaggtgaa	300
gcgcgtccca	ctgcaaaggc	tgccatcgt	gagagggacc	cagctctttg	aggacaagta	360
tgccctggct	gtgctagaca	accgagatcc	tcaggacaat	gtcgccgcct	ccacccagg	420
cagaacccca	gaggggctgc	gggagctgca	gcttcgaagt	ctcacagaga	tcctgaaggg	480
aggagttttg	atccgtggga	accctcagct	ctgctaccag	gacatggttt	tgtggaagga	540
cgtcttccgc	aagaataacc	aactggctcc	tgctgatata	gacaccaatc	gttcccgggc	600
ctgtccacct	tgtgcccccg	cctgcaaaga	caatcactgt	tggggtgaga	gtccggaaga	660
ctgtcagatc	ttgactggca	ccatctgtac	cagtggttgt	gcccgggtgca	agggcgctag	720
cctgcccact	gactgctgcc	atgagcagtg	tgctgccggc	tgacggggcc	ccaagcactc	780
tgactgcctg	gcctgcctcc	acttcaacca	cagtggcacc	tgtgagctgc	actgcccagc	840
cctggtcacc	tacaacacag	acacgtttga	gtccatgccc	aatcccagg	gccgggtatac	900
attcggcgcc	agctgtgtga	ctgcctgtcc	ctacaactac	ctttctacgg	acgtgggatc	960
ctgcaccctc	gtctgcccc	tgcaacaacca	agagggtgaca	gcagaggatg	gaacacagcg	1020
gtgtgagaag	tgacgcaagc	cctgtgccc	agtgtgctat	ggtctgggca	tggagcactt	1080
gcgagagggtg	agggcagtta	ccagtgccaa	tatccaggag	tttgctggct	gcaagaagat	1140
ctttgggagc	ctggcatttc	tgccggagag	ctttgatggg	gacccagcct	ccaacaotgc	1200
cccgtccag	ccagagcagc	tccaagtgtt	tgagactctg	gaagagatca	caggttacct	1260
atacatctca	gcatggccgg	acagcctgcc	tgacctcagc	gtcttccaga	acctgcaagt	1320

aatccgggga cgaattctgc acaatggcgc ctactcgctg accctgcaag ggctgggcat 1380
cagctggctg gggctgcgct cactgaggga actgggcagt ggactggccc tcatccacca 1440
taacacccac ctctgcttcg tgcacacggt gccctgggac cagctctttc ggaacccgca 1500
ccaagctctg ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tgtgtgggag agggcctggc 1560
ctgccaccag ctgtgcgccc gagggcactg ctgggggtcca gggcccaccc agtgtgtcaa 1620
ctgcagccag ttccttcggg gccaggagtg cgtggaggaa tgccgagtag tgcaggggct 1680
ccccagggag tatgtgaatg ccaggcactg tttgccgtgc caccctgagt gtcagcccca 1740
gaatggctca gtgacctgtt ttggaccgga ggctgaccag tgtgtggcct gtgcccacta 1800
taaggacctt ccttctctgc tggcccgctg cccagcggt gtgaaacctg acctctccta 1860
catgcccato tggaagtctc cagatgagga gggcgcatgc cagccttgcc ccatcaactg 1920
caccactcc tgtgtggacc tggatgacaa gggctgcccc gccgāgcaga gagccagccc 1980
tctgacgtcc atcgtctctg cgggtggttg cattctgctg gtcgtggtct tgggggtggt 2040
ctttgggatc ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa

<210> 13
<211> 2086
<212> DNA
<213> human/rat



<400> 13
ccggggccgga gccgcaatga tcatcatgga gctggcgggc tgggtgccgt gggggttect 60
cctcgccctc ctgcccccg gaatcgcgga caccacagt tgtaccggca cagacatgaa 120
gttgccgctc cctgccagt ctgagacca cctggacatg ctccgccacc tgtaccaggg 180
ctgtcaggta gtgcaggga acttgagct tacctacgtg cctgccaatg ccagcctctc 240
attcctgcag gacatccagg aagttcaggg ttacatgctc atcgtcaca accaggtgaa 300
gcgcgtccca ctgcaaaggc tgcgcatcgt gagagggacc cagctctttg aggacaagta 360
tgccctggct gtgctagaca accgagatcc tcaggacaat gtgcgcgct ccacccagg 420
cagaacccca gaggggctgc gggagctgca gcttcgaagt ctacagaga tcctgaaggg 480
aggagttht atccgtggga accctcagct ctgctaccag gacatggttt tgtggaagga 540
cgtcttccgc aagaataacc aactggctcc tgtcgatata gacaccaatc gttcccgggc 600
ctgtccacct tgtgccccg cctgcaaaga caatcaactg tgggggtgaga gtccggaaga 660
ctgtcagatc ttgactggca ccatctgtac cagtggttgt gcccggtgca agggccggct 720

gcccactgac tgctgccatg agcagtgtgc cgcagggtgc acgggccccca agcattctga 780
 ctgcctggcc tgcctccact tcaatcatag tggatatctgt gagctgcact gccagaccct 840
 cgtcacctac aacacagaca cttttgagtc catgcacaac cctgaggggtc gctacacctt 900
 tggtgccagc tgcgtgacca cctgccccta caactacctg tctacggaag tgggagctag 960
 ctgcaccctc gtctgcccc tgcacaacca agaggtgaca gcagaggatg gaacacagcg 1020
 gtgtgagaag tgcagcaagc cctgtgcccg agtgtgctat ggtctgggca tggagcactt 1080
 gcgagaggtg agggcagtta ccagtccaa tatccaggag tttgctggct gcaagaagat 1140
 ctttgggagc ctggcatttc tgccggagag ctttgatggg gaccagcct ccaacactgc 1200
 cccgctccag ccagagcagc tccaagtgtt tgagactctg gaagagatca caggttacct 1260
 atacatctca gcatggccgg acagcctgcc tgacctcagc gtcttccaga acctgcaagt 1320
 aatccgggga cgaattctgc acaatggcgc ctactcgctg accctgcaag ggctgggcat 1380
 cagctggctg gggctgcgct cactgaggga actgggcagt ggactggccc tcatccacca 1440
 taacaccac ctctgcttcg tgcacacggt gccctgggac cagctctttc ggaaccogca 1500
 ccaagctctg ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tgtgtgggcg agggcctggc 1560
 ctgccaccag ctgtgcgccc gagggcactg ctgggggtcca gggcccaccc agtgtgtcaa 1620
 ctgcagccag ttccttcggg gccaggagtg cgtggaggaa tgccgagtac tgcaggggct 1680
 ccccaggag tatgtgaatg ccaggcactg tttgocgtgc caccctgagt gtcagcccca 1740
 gaatggctca gtgacctgtt ttggaccgga ggctgaccag tgtgtggcct gtgcccacta 1800
 taaggaccct cccttctgcg tggcccgctg cccagcgggt gtgaaacctg acctctcta 1860
 catgcccato tggaagtttc cagatgagga gggcgcatgc cagccttgcc ccatcaactg 1920
 caccactcc tgtgtggacc tggatgacaa gggctgcccc gcgagcaga gagccagccc 1980
 tctgacgtcc atcgtctctg cggtggttgg cattctgctg gtcgtggtct tgggggtggt 2040
 ctttgggatc ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa 2086

<210> 14

<211> 2086

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 14

ccgggcccga gccgcaatga tcatcatgga gctggcggcc tggtgccgct gggggttcct 60
 cctcgccctc ctgcccccg gaatcgoggg caccgaagtg tgtaccggca cagacatgaa 120

gttgcggtc	cctgccagtc	ctgagacca	cctggacatg	ctccgccacc	tgtaccagg	180
ctgtcagga	gtgcaggga	acttggagct	tacctacgtg	cctgccaatg	ccagcctctc	240
attcctgcag	gacatccagg	aagttcagg	ttacatgctc	atcgctcaca	accaggtgaa	300
gcgcgtccca	ctgcaaaggc	tgcgcacgtg	gagagggacc	cagctctttg	aggacaagta	360
tgccctggct	gtgctagaca	accgagatcc	tcaggacaat	gtcgccgcct	ccaccccagg	420
cagaacccca	gaggggctgc	gggagctgca	gcttcgaagt	ctcacagaga	tcctgaagg	480
aggagttttg	atccgtggga	accctcagct	ctgctaccag	gacatggttt	tgtggaagga	540
cgtcttccgc	aagaataacc	aactggctcc	tgtcgatata	gacaccaatc	gttcccgggc	600
ctgtccacct	tgtgcccccg	cctgcaaaga	caatcactgt	tggggtgaga	gtccggaaga	660
ctgtcagatc	ttgactggca	ccatctgtac	cagtggttgt	gcccgggtgca	agggccggct	720
gcccactgac	tgctgccatg	agcagtgtgc	cgcaggctgc	acgggcccga	agcattctga	780
ctgcctggcc	tgcctccact	tcaatcatag	tggatatctgt	gagctgcact	gcccagccct	840
cgtcacctac	aacacagaca	cctttgagtc	catgcacaac	cctgagggtc	gctacacctt	900
tggtgccagc	tgcgtgacca	cctgccccta	caactacctg	tctacggaag	tgggatcctg	960
cactctggtg	tgtccccga	ataaccaaga	ggtcacagct	gaggacggaa	cacagcgttg	1020
tgagaaatgc	agcaagccct	gtgctcgagt	gtgctatggt	ctgggcatgg	agcaccttcg	1080
aggggcgagg	gccatcacca	gtgacaatgt	ccaggagt	gatggctgca	agaagatctt	1140
tgggagcctg	gcatttttgc	cggagagctt	tgatggggac	ccctcctccg	gcattgctag	1200
cccgtccag	ccagagcagc	tccaagtgtt	tgagactctg	gaagagatca	caggttacct	1260
atacatctca	gcattggcgg	acagcctgcc	tgacctcagc	gtcttcaga	acctgcaagt	1320
aatccgggga	cgaattctgc	acaatggcgc	ctactcgtg	accctgcaag	ggctgggcat	1380
cagctggctg	gggctgcgt	cactgaggga	actgggcagt	ggactggccc	tcattccacca	1440
taacacccac	ctctgcttcg	tgcacacggt	gccctgggac	cagctctttc	ggaacccgca	1500
ccaagctctg	ctccacactg	ccaaccggcc	agaggacgag	tgtgtgggcg	agggcctggc	1560
ctgccaccag	ctgtgcgcc	gagggcactg	ctggggtcca	gggccaccc	agtgtgtcaa	1620
ctgcagccag	ttccttcggg	gccaggagt	cgtggaggaa	tgccgagtac	tgcaggggct	1680
cccaggagg	tatgtgaatg	ccaggcactg	tttgccgtgc	cacctgagt	gtcagcccca	1740
gaatggctca	gtgacctgtt	ttggaccgga	ggctgaccag	tgtgtggcct	gtgccacta	1800
taaggacctt	cccttctgcg	tggcccgctg	cccagcgggt	gtgaaacctg	acctctccta	1860
catgcccatc	tggaagtttc	cagatgagga	gggcgcacgc	cagccttgcc	ccatcaaactg	1920
caccactcc	tgtgtggacc	tggatgacaa	gggctgcccc	gccgagcaga	gagccagccc	1980

tctgacgtcc atcgtctctg cggtggttgg cattctgctg gtcgtggtct tgggggtggt 2040
ctttgggatc ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtaa 2086

<210> 15

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 15
ccggaagtaa ataatcgacg ttcaaataat cgacgttcaa ataatcgacg ttcaaataat 60

cgacgttcaa t 71
<210> 16

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 16
ctagattgaa cgtcgattat ttgaacgtcg attatttgaa cgtcgattat ttgaacgtcg 60

attattttact t 71

<210> 17

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 17
ccggaagtaa ataatagagc ttcaaataat agagcttcaa ataatagagc ttcaaataat 60

agagcttcaa t 71

<210> 18

<211> 71

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 18

```
<400> 22
aaacttgaac gtcgattatt tgaacgtcga ttatttgaac gtcgattatt tgaacgtcga 60
ttat 64
```

<210> 23

<211> 68

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 23

ctagataata gagcttcaaa taatagagct tcaaataata gagcttcaaa taatagagct 60
tcaagttt 68

<210> 24

<211> 64

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 24

aaacttgaag ctctattatt tgaagctcta ttatttgaag ctctattatt tgaagctcta 60
ttat 64

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 25

taatacgact cactataggg 20

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 26

ggccggttac ccgcgattcc ggggggcagg ag 32

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 27

ccggctagct agcctgtcct tcttgcagga tatcc

35

<210> 28

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 28

ccggctagct agcggagggg tcttgatcca gcgga

35

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 29

ccggctagct agcctgcccc ctgactgctg ccatg

35

<210> 30

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 30

ccggctagct agctgcaccc tegtctgccc cctgc

35

<210> 31

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 31

ccggctagct agcccgctcc agccagagca gctcc .

35

<210> 32

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 32

ccggctagct agcaacaccc acctctgctt cgtgc

35

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 33

ccggctagct agccccaggg agtatgtgaa tgcca

35

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 34

tagaaggcac agtcgaggct

20

<210> 35

<211> 43

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 35

ccggctagct agccgcgatt ccgggggggca ggagggcgag gag

43

<210> 36

<211> 69

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 36

ctaggcatca tcatcatcat cataatggtc ataccggtga acaaaaactc atctcagaag 60

aggatctgg 69

<210> 37

<211> 69

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 37

ctagccagat cctcttctga gatgagtttt tgttcaccgg tatgaccatt atgatgatga 60

tgatgatgc 69

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 38

ccggctagct agcgctggca ttggcaggca cgtag

35

<210> 39

<211> 35

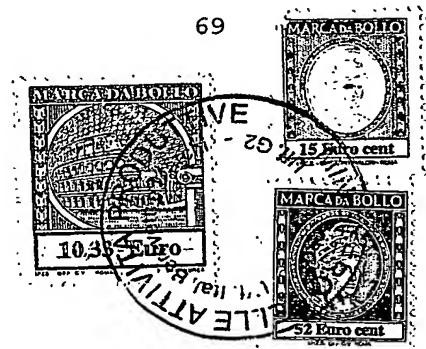
<212> DNA

<213> human/rat

<400> 39

ccggctagct agccaggatc tctgtgagac ttoga

35



<210> 40

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 40

ccggctagct agcgcccttg caccgggcac aacca

35

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> human/rat

<400> 41

ccggctagct agctcccact tccgtagaca ggtag

35

<210> 42

<211> 35

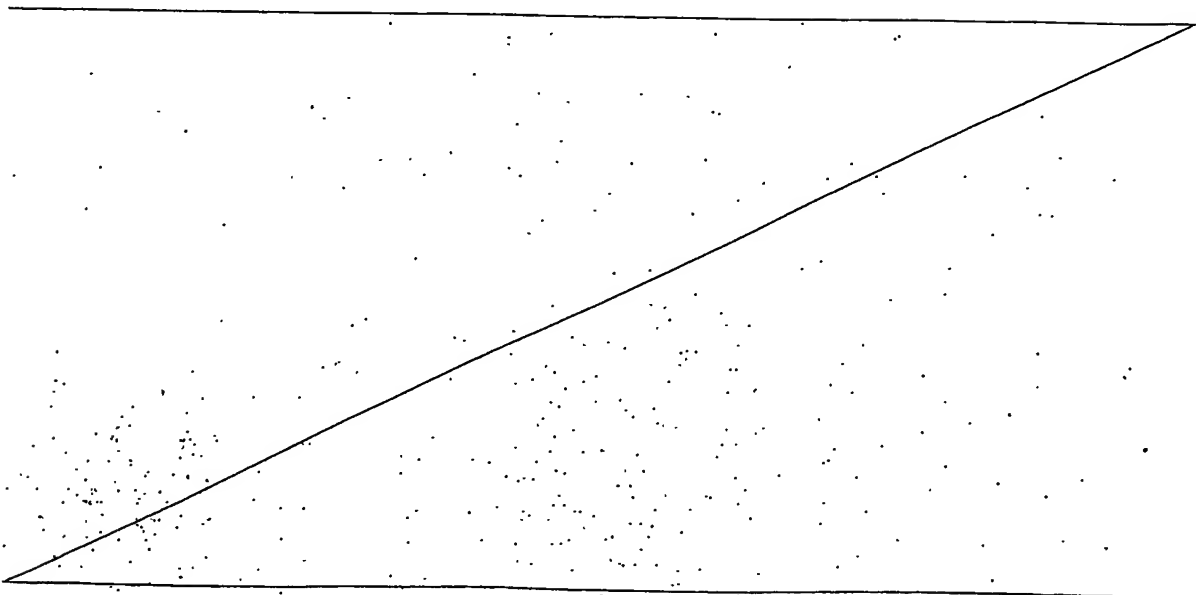
<212> DNA

<213> human/rat

<400> 42

ccggctagct agcaatgccg gaggaggggt cccca

35



RIVENDICAZIONI

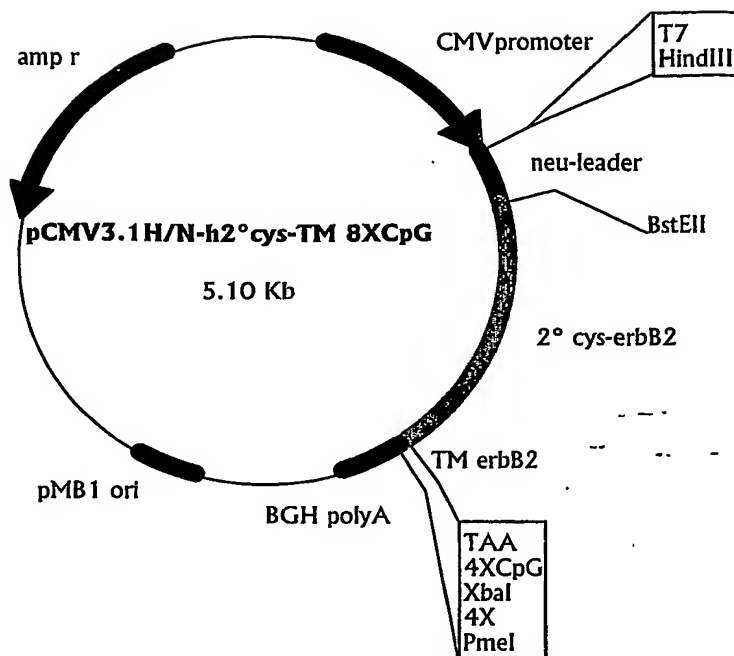
1. Un plasmide contenente una sequenza codificante un frammento di p185^{neu} scelta dal gruppo comprendente SEQ ID N. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.
2. Plasmide secondo la rivendicazione 1, contenente inoltre un promotore della trascrizione.
3. Plasmide secondo la rivendicazione 2, dove detto promotore è CMV.
4. Plasmide secondo la rivendicazione 1, contenente inoltre almeno 4 motivi CpG.
5. Plasmide secondo la rivendicazione 4, contenente almeno 8 motivi CpG.
6. Composizione farmaceutica contenente un plasmide secondo le rivendicazioni 1-5 insieme a veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.
7. Composizione secondo la rivendicazione 6, idonea alla somministrazione parenterale.
8. Composizione secondo la rivendicazione 7, in forma di soluzione iniettabile.
9. Uso di un plasmide secondo le rivendicazioni 1-5 per preparare una composizione farmaceutica da utilizzare nel trattamento preventivo o terapeutico di soggetti a rischio di sviluppo di tumori p185^{neu} positivi, o di pazienti portatori di tumori primari, metastasi o recidive di tumori p185^{neu} positivi.
10. Uso secondo la rivendicazione 9, per la preparazione di un vaccino a DNA.

Milano, 9 Ottobre 2003

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



FIGURA 1



MI 2003A0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo

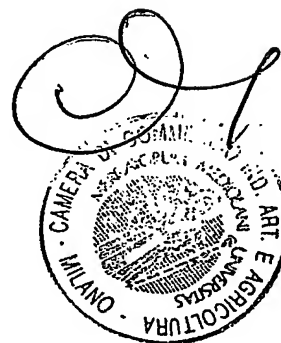
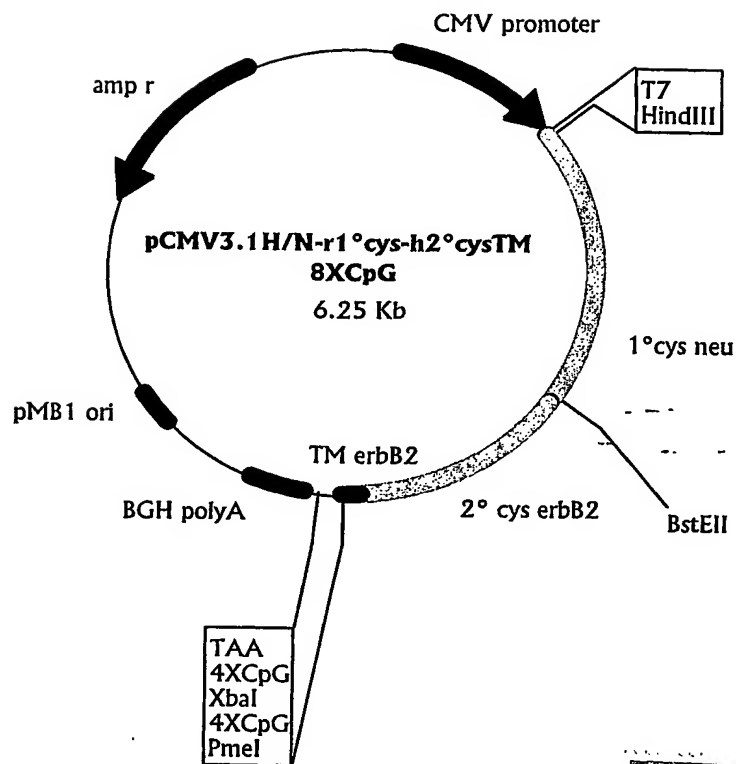


FIGURA 2



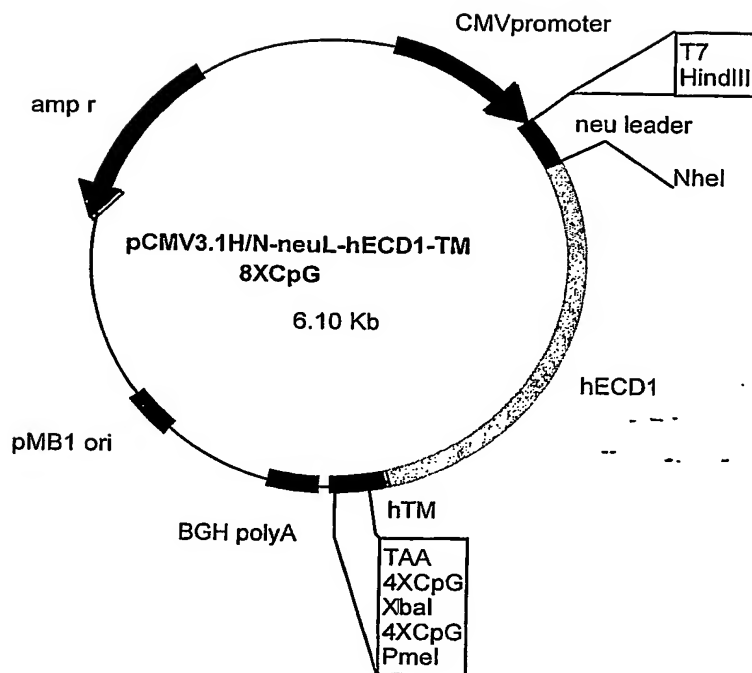
MI 2003A0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]



FIGURA 3



MI 2003A0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]

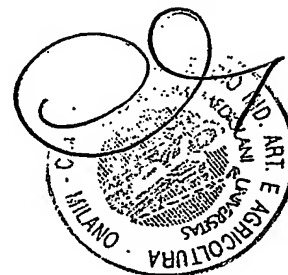
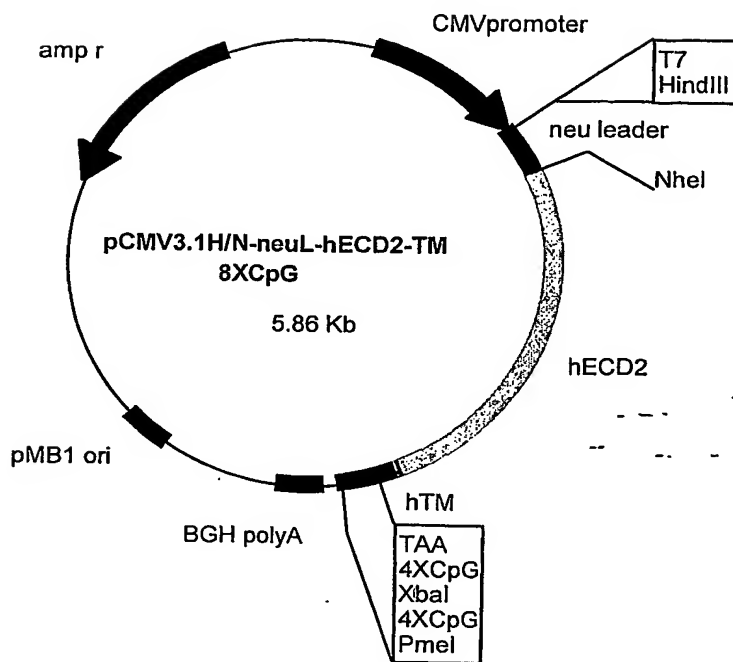


FIGURA 4



MI 2003 10019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]

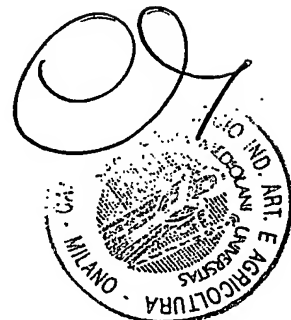
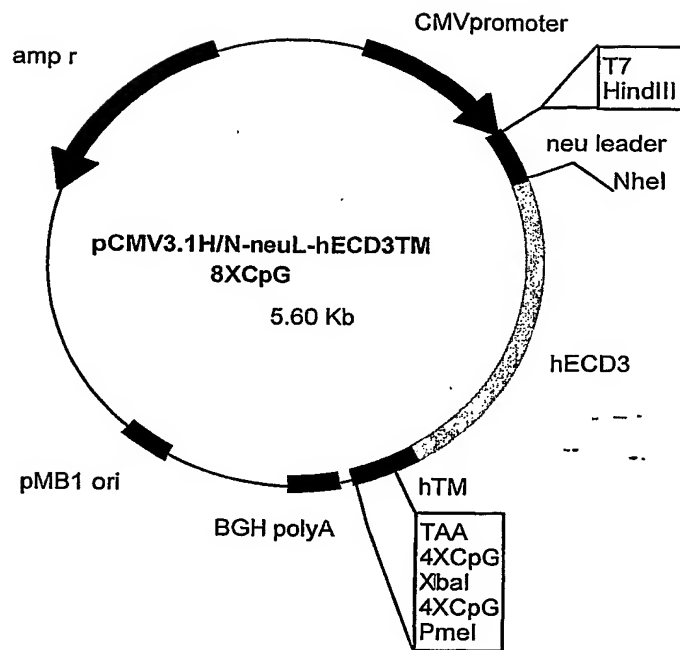


FIGURA 5



MI 2003 A 001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Banfi Paolo

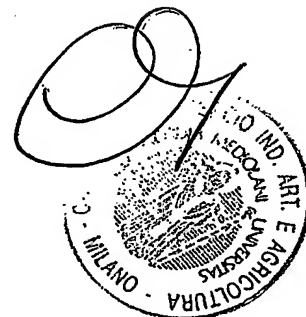
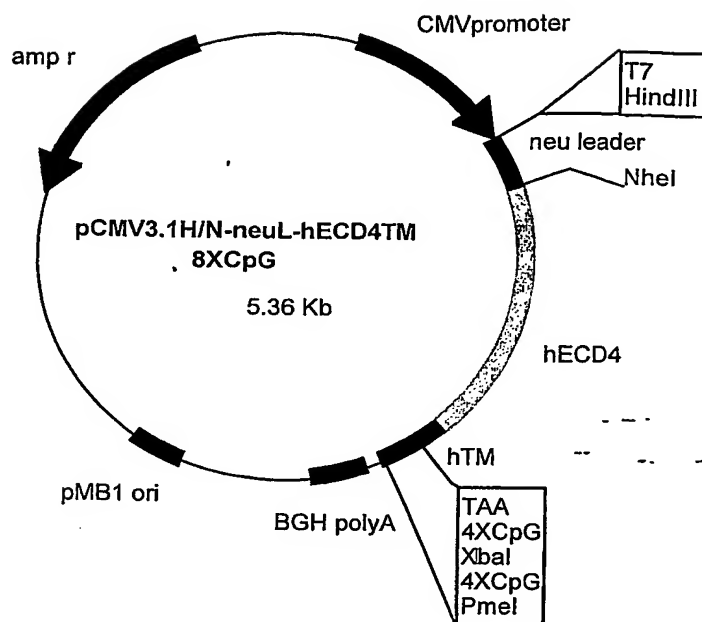


FIGURA 6



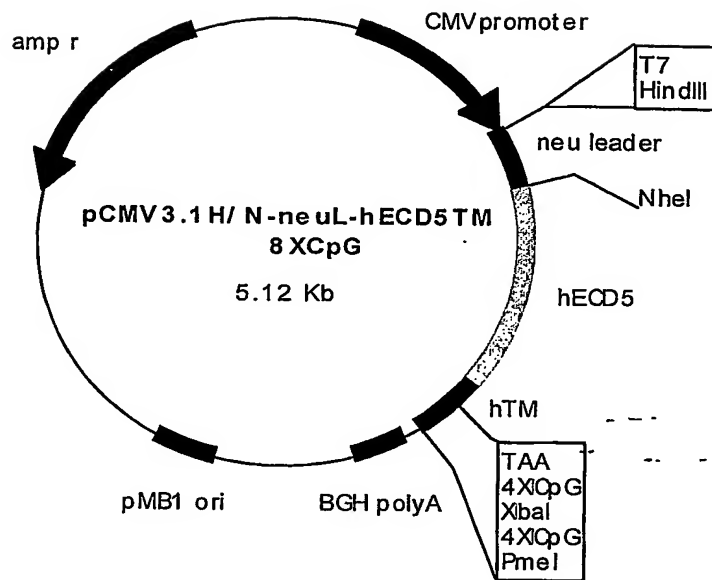
MI 200 3 A 001 942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]



FIGURA 7



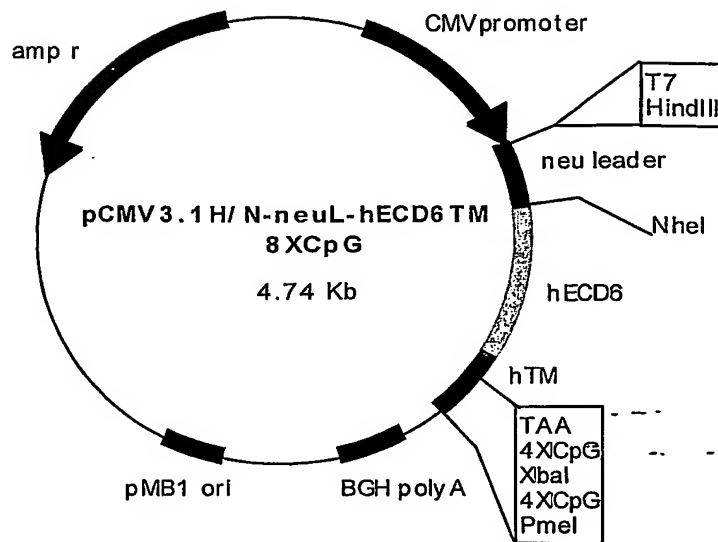
MI 200 3 A 00 1 9 4 2 /

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature



FIGURA 8



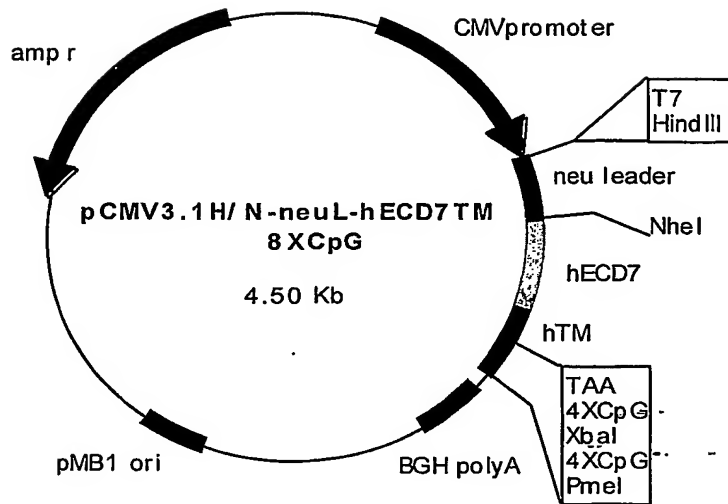
MI 2003'0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

BB



FIGURA 9



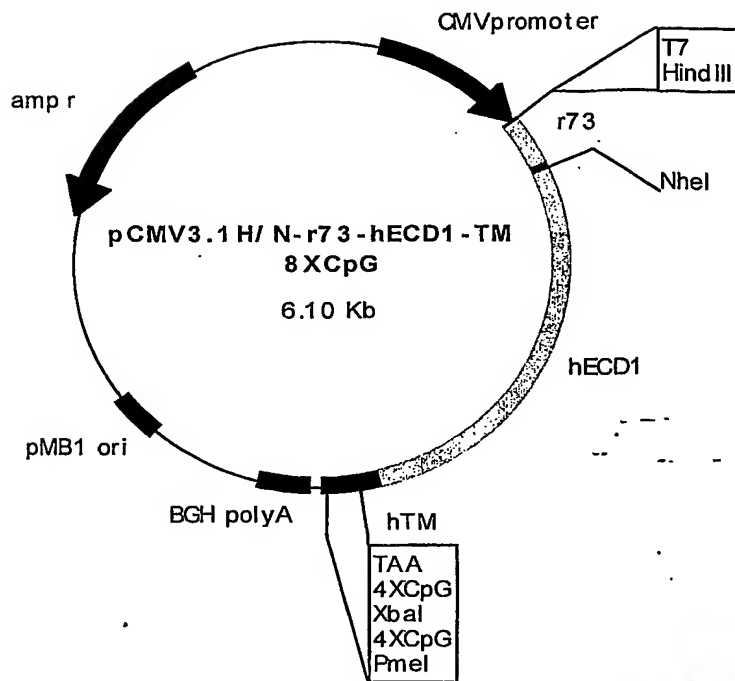
2003A001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]



FIGURA 10



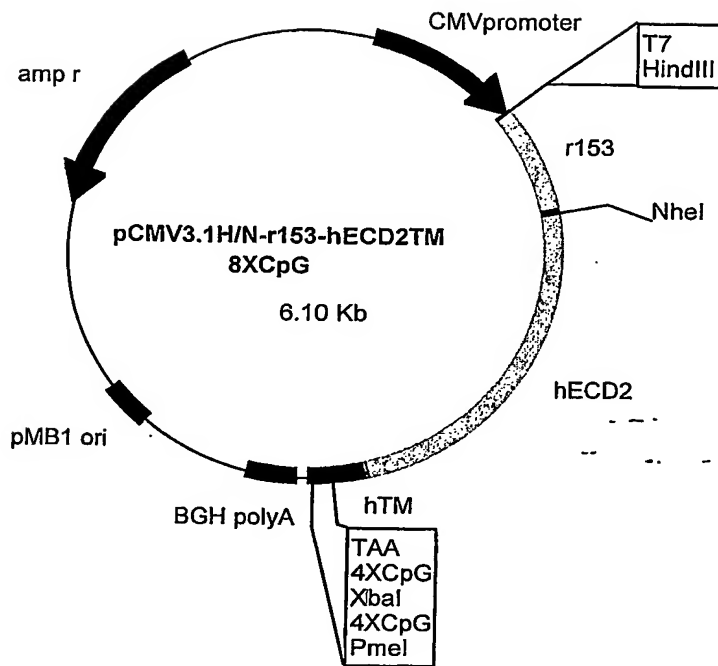
MI 2003A001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]



FIGURA 11



MI 200 3 A 001 9421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]

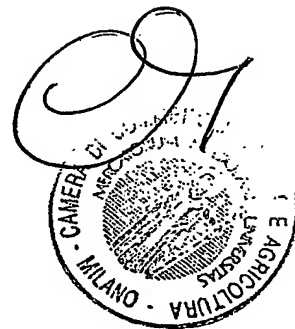
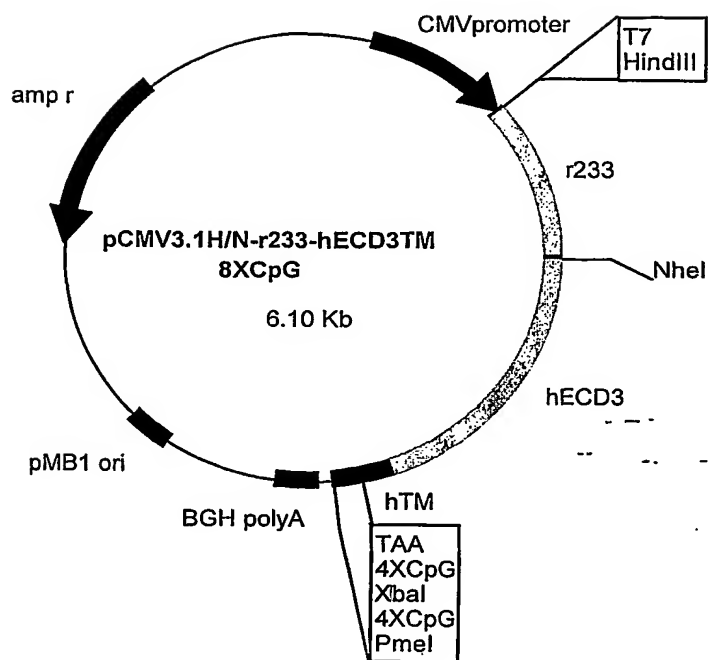


FIGURA 12



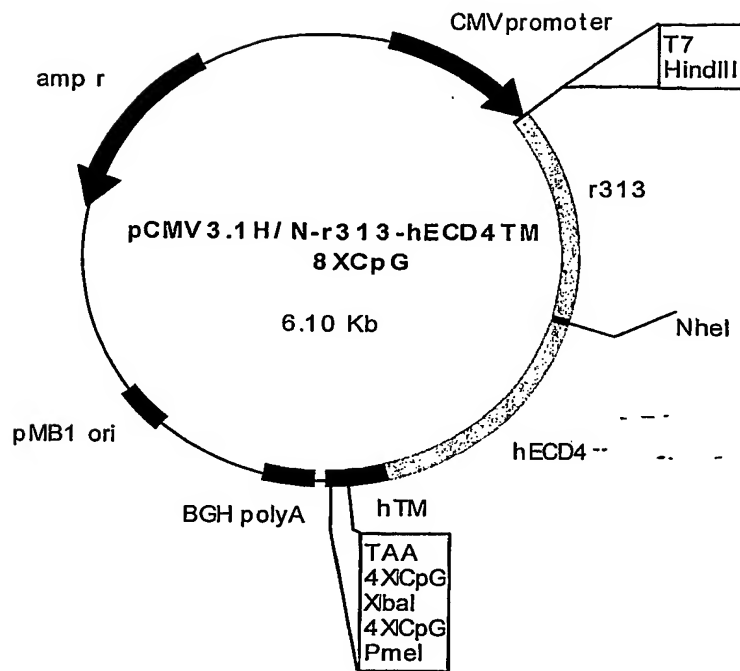
MI 2003 A 0019421

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]



FIGURA 13



MI 2003A001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

[Handwritten signature]

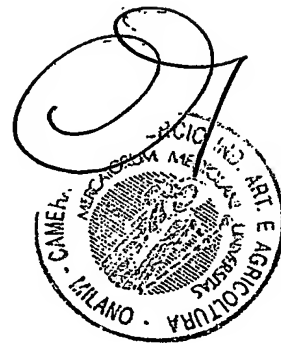
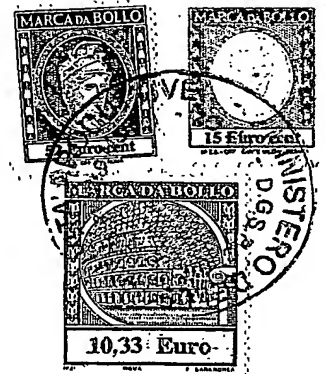
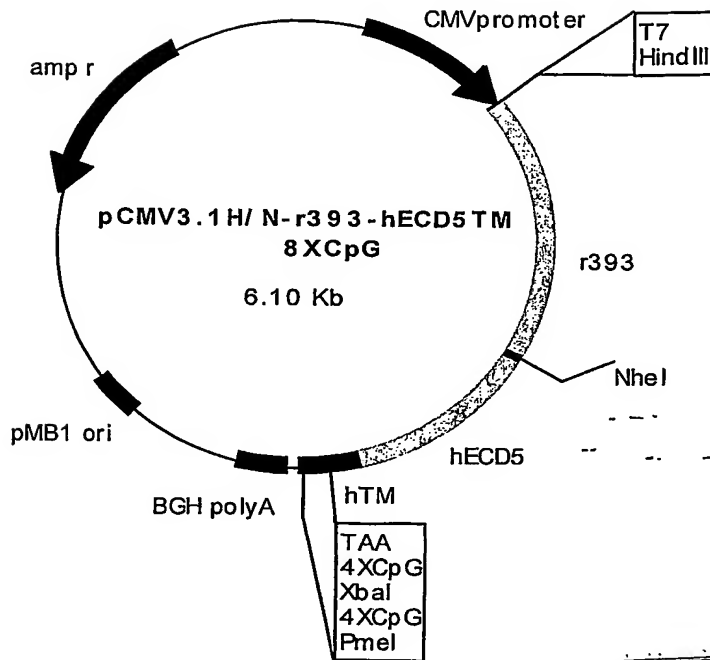


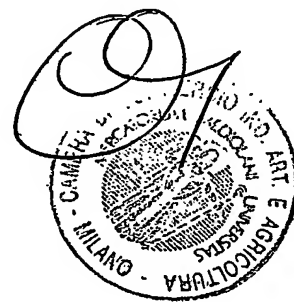
FIGURA 14



MI 2003A001942

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paul



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP04/011161

International filing date: 06 October 2004 (06.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: MI2003A 001942
Filing date: 09 October 2003 (09.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 31 January 2005 (31.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.